ISSN　0916－2674
CODEN：TDGHFG

筑波大学
技術報告

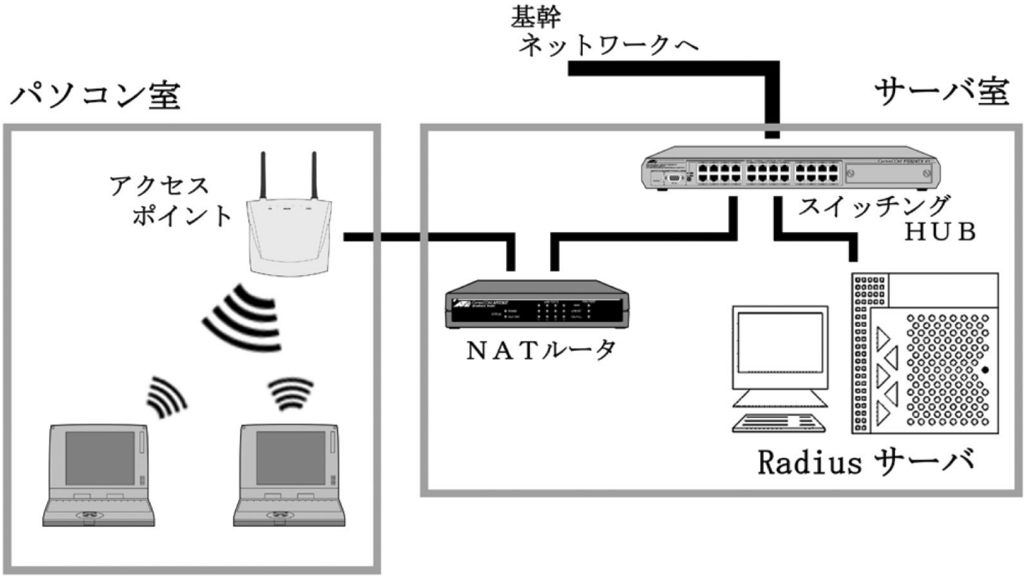
No.24

UNIVERSITY OF TSUKUBA TECHNICAL REPORT

2004

第３回筑波大学技術職員技術発表会報告集

web版



筑波大学「技術報告」№.２４（２００４）の発刊に際して

本学の教育・研究においては、学生・教員・事務職員の活動が、技術職員の日頃の献身に支えられていることは申すまでもありませんが、技術職員に期待する使命の第一は、高いレベルの技術支援であります。２００４年４月から、わが国のすべての国立大学は「国立大学法人」という独立行政法人になり、同時に、すべての教職員の身分は非公務員となります。法人化後は、今まで以上に各人の専門技術を向上させるとともに、広い視野から自分のスキルを見直して、学内のみならず、社会のニーズに応えられるように、研鑽を積むことが期待されます。例えば、今まで学内共同利用の研究支援センターであったところが、学外にもサービスを提供するようになることが考えられます。そうなれば、はるかに高い信頼性やサービス品質、迅速性、柔軟性などが求められます。その要求に応えることが、センターの技術の向上をもたらします。それはまた、センターにとっての外部資金の獲得となるとともに、直接の社会貢献により、高い満足感を与えるものとなるでしょう。さらに、成果の事業化や、学外にベンチャー企業を起こすことにつながるかもしれません。

ここに発刊を迎えた「技術報告」№.２４は、３月１６日（火）に開催される第３回筑波大学技術職員技術発表会での報告論文と、それ以外の技術報告から構成されています。これらの報告は、本学の研究センターや教育研究支援室の技術職員による創造的努力の成果を表わすものです。これらの中には、高い学術的価値を持つ研究や、教育研究支援の結晶が含まれています。この報告書により、本学の技術職員の多岐にわたる分野における技術レベルの高さが学内外に認知され、併せて、各方面よりの評価をいただく機会となることを期待します。

２００４年３月

筑波大学副学長（研究担当）　高 木 英 明

目　次

筑波大学「技術報告」№.２４（２００４）の発刊に際して
高 木 英 明 (筑波大学研究担当副学長)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ i

技 術 発 表 会 報 告 集

血圧調節におけるカルシウムの対立する二つの役割
秋山佳代、須藤伝悦　人間総合等教育研究支援室（医学系）・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

人脳内に分布する神経伝達物質の定量的解析法の開発
矢部一徳、秋山佳代、須藤伝悦　人間総合等教育研究支援室（医学系）・・・・・・・5

ヒト赤血球および白血球の補体制御膜蛋白発現のフローサイトメトリーによる検討
佐藤晶子　人間総合等教育研究支援室（医学系）　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10

計算物理学研究センターにおけるインターネットライブ中継システムの構築と運用
富田雅、神谷紀彦　研究協力部研究協力課（計算物理学研究センター）・・・・・・・・15

Unix/Windows 一石二鳥プログラミング　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19
木村博美　人文・数理等教育研究支援室（加速器センター）

論文の pdf 化テクニック ―冊子印刷、web 掲載を前提に―
大和良広 人文・数理等教育研究支援室（加速器センター）・・・・・・・・・・・・・・・・22

中枢機能に対するスポーツの効果
須藤伝悦、秋山佳代　人間総合等教育研究支援室（医学系）・・・・・・・・・・・・・・・30

デジタルカメラを用いた蛍光撮影装置の開発
鷺野谷秀夫　病院部医事課中央診療医務係・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34

超並列型 MR マイクロスコープ用プローブの製作
保谷博、大石健一、河原井勝一
生命・情報等教育研究支援室（物理工学系）　・・・・・・・・・・・・・・・・・・38

手びきのこぎりのひき曲がり簡易検出方法
田所千明　生命・情報等教育研究支援室（農林工学系）　・・・・・・・・・・・・・・・・・・42

ピエゾ素子による位置設定用ユニットの駆動回路製作
淀縄文男、中原繁男
生命・情報等教育研究支援室（物理工学系）・・・・・・・・・・・・・・・・・・48

全ゲノム連鎖解析による疾患感受性遺伝子座の検索
伊藤清子 人間総合等教育研究支援室（医学系）有波忠雄（基礎医学系）・・・・・・ 53

レーザーマイクロダイセクション(LDM)法による
凍結組織切片からの細胞採取と nested RT-PCR 解析
小野瀬恵里子　人間総合等教育研究支援室（医学系）・・・・・・・・・・・・・・・・・・57

筑波大学内 Web データの全文検索システムの構築
佐藤守　研究協力部研究協力課（学術情報処理センター）・・・・・・・・・・・・・・・・・・62

GAMMA10 用縦型電動発電機の分解点検
嶋頼子　人文・数理等教育研究支援室（プラズマ研究センター）・・・・・・・・・・・・66

FIB 装置を用いた微細加工
室井光裕　生命・情報等教育研究支援室（物質工学系）・・・・・・・・・・・・・・・・69

つくば生物ジャーナルのオンライン刊行について
安部七恵　生命・情報等教育研究支援室（生物学類）
丸尾文昭（生物科学系）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・73

酵素部分欠損症による神経疾患とその遺伝子解析
新里寿美子　人間総合等教育研究支援室（医学系）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・76

ドライポンプのヘリウムタイト改良
近藤裕、宮内幹雄、敦賀将太
人文・数理等教育研究支援室（低温センター）・・・・・・・・・・・・・・・81

美術領域における技術的スキルアップのためのアルミ鋳造スタディ
林剛人丸　人間総合等教育研究支援室（芸術学系）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・86

病気の原因となる細胞やタンパクの局在を検索するための免疫二重染色法について
磯山茂美　人間総合等教育研究支援室（医学系）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 92

ELISA 法による *staphylococcus aureus* に対するヒト血清中抗体の測定
櫻井秀子　人間総合等教育研究支援室（医学系）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・94

HLA 検査の紹介
秦泉寺裕子　人間総合等教育研究支援室（医学系）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 98

日本の高山帯とシベリアサヤン山脈における単子葉植物
Carex（スゲ属）集団内の種組成の比較
路川宗夫　生命・情報等教育研究支援室（生物学類）　・・・・・・・・・・・・・・・・・・103

実験用海底基盤の制作と設置および応用研究について
土屋泰孝　研究協力部研究協力課（下田臨海実験センター）　・・・・・・・・・・・・・・・ 108

技　術　報　告

情報環境の整備と改善
川上彰、北原匡、北原その美　生命・情報等教育研究支援室（社会工学系）・・111

イメージングアナライザーによる表面汚染密度の測定実習の検証
伊藤達夫　人文・数理等教育研究支援室（アイソトープセンター）・・・・・・・・・・・119

実験室の法規制
平田久子　人文・数理等教育研究支援室（物理学系）
橋野正美　人文・数理等教育研究支援室（総務・研究協力担当）　・・・・・・・・・・・126

ブナ伐採跡地に植樹したブナ苗木の成長
清水　悟　研究協力部研究協力課（菅平高原実験センター）　・・・・・・・・・・・・・133

パーソナルコンピュータによるＣＡＭＡＣデータ収集系
杉山昭彦　人文・数理等教育研究支援室（プラズマ研究センター）・・・・・・・・・・・137

溶接応力を利用した反りの修正
石川健司　人文・数理等教育研究支援室（工作センター）・・・・・・・・・・・・・・・・140

第３回筑波大学技術職員
技術発表会報告集

開催日：2004年3月16日
会場：筑波大学臨床講堂

筑波大学技術職員技術発表会の公式ウエブサイト
http://www.tac.tsukuba.ac.jp/tech2003/

血圧調節におけるカルシウムの対立する二つの役割

秋山佳代[1]、須藤伝悦[2]

筑波大学人間総合等教育研究支援室（医学系）

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

先に確立したメカニズムと分析技術を用いて実験し、血圧調節において、カルシウムは対立する二つの作用を持つことを明らかにした。一つは、広く知られている末梢の血管平滑筋を介した昇圧作用であり、二つ目は、中枢のカルシウム依存性ドーパミン合成系を介した降圧作用である。後者は、日常の高カルシウム食により高血圧症を予防する上で極めて重用なものである。

１．はじめに

カルシウムと血圧の関係は、分子生物学から臨床領域まで広く研究されてきた。多くの研究者は、血中カルシウムの増加が血管平滑筋を収縮し、摩擦を高める事により血圧が上昇する事を報告している。そのため、ある種のカルシウムブロッカー剤が高血圧症の治療薬として使用されている。一方、疫学調査や動物実験によって、カルシウムが血圧を降下させる事が示唆されており、血圧に対するカルシウムの相反する作用は、医学上の大きなテーマの一つになっていた。昇圧作用については基礎的メカニズムが解明されているが、降圧作用に関しては解明されていない。

先に開発したBrain Mapping Analyzerや行動学的、薬理学的、生化学的手法を用いて、日常の生活を通じて摂取されたカルシウムが、中枢のカルモジュリンを活性化し、タイロシン水酸化酵素（カテコルアミン合成の律速酵素）を賦活化し、引き続きドーパミン（カテコルアミンの一つで、神経伝達物質）の合成能を高める事を解明した[1-4]。このメカニズムを様々な疾病の発症機序解明に応用してきたが、その一環としてカルシウムの降圧作用を研究してきた。

２．カルシウムによる脳内ドーパミンの合成調節

はじめに、カルシウムによる脳内ドーパミンの合成調節のメカニズムに関して簡単に述べる。マウスの腹腔内にエタノールを投与すると、行動の上で睡眠状態に陥る。このエタノール誘発性の睡眠時間の長さは、脳内生体アミン（カテコルアミンの他、セロトニン等も含む）の濃度によって調節されているが、カルシウムの脳室内投与によっても濃度依存的に増加する。この睡眠時間を延長するカルシウムの効果は、カテコルアミンの合成酵素阻害剤やカルモジュリン拮抗剤によって抑えられる。この結果から、カルシウムがカルモジュリン系を介してカテコルアミンの合成酵素を賦活化し、濃度の高くなったカテコルアミンが睡眠時間を延長させたと示唆される[2]。この実験を基に、高速液体クロマトグラフィーによって、脳内のカテコルアミン濃度に対するカルシウムの効果を分析した。その結果、カルシウムの投与によって大脳全体で約 25%のドーパミンの増加が確認された[1]。しかし、生化学的方法では、ドーパミンの合成がどの部位で高められたのか詳細な同定ができなかった。

この部位を明らかにするため、Brain Mapping Analyzer を開発した[5]。この装置は、落射蛍光顕微鏡のカメラマウントに高感度の光電子増倍管をセットし、光路にピンホールを挿入しているため、標本内の微小な一点から発せられる蛍光だけを選択して測光できる。さらに、顕微鏡の電動ステージがコンピューターで制御されており、二次元方向に 0.25 μm 以上のステップ幅で移動するため、標本全面を微細にスキャンすることができる。一度に小動物の脳切片全体を分析することが可能で、各領域の蛍光強度の分布を細胞レベルで定量できる。テレビカメラを用いた画像解析法や電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー法と比べて、少なくとも 4 桁以上微細で正確な分析結果が得られる。しかも、脳切片上の非特異的な蛍光を完全に消去することも可能で、純粋な神経化学物質だけを選択して定量できる他、一枚の標本から複数の物質を個別に定量して、それらの分布を比較解析することも可能である[4,5]。

一枚のラットの脳切片をタイロシン水酸化酵素、カルモジュリン依存性プロティンキナーゼ II 及びカルモジュリンの抗体によって蛍光免疫組織化学的に三重染色し、Brain Mapping Analyzer を用いて 25 万領域に分割し、それぞれの物質の分布を定量的に分析した。線条体と側坐核には、三物質が共に高濃度で分布しており[4]、さらに、これらの部位でカルシウムがカルモジュリン依存系を介してドーパミンの合成系を調節している事を確認した[3]。

３．中枢カルシウム依存性の降圧作用

中枢ドーパミンの増加は、血圧を降下させる事が知られている。カルシウムがドーパミンの合成を高める事より、レベルの高くなったドーパミンが血圧を下げる事が推察されるので確認した。

覚醒ラットの側脳室にカルシウムを投与すると、投与後６分から１時間以上に渡り血圧が有意に降下する。このカルシウムの降圧作用は、カルモジュリンの特異的な拮抗剤、カテコルアミンの合成酵素阻害剤、神経節遮断薬或いはドーパミン D_2 レセプター阻害剤の何れかの投与によって抑制されるが、ド

---

[1] E-mail: akiyamak@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3330

[2] E-mail: dsutoo@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3113

ーパミン D_1 レセプター阻害剤の投与によっては何の変化も見られない[6-8]（図１）。

この結果より、中枢のカルシウムは、カルモジュリン依存系を介してドーパミンの合成を高め、レベルの高くなったドーパミンが D_2 レセプターを介して血圧調節中枢に作用し、交感神経系を抑制する事によって血圧を降下させると考えられる。

４．血中のカルシウムと血圧

脳室内に投与したカルシウムがドーパミンの作用を介して血圧を降下させる事を確認したが、末梢から投与したカルシウムによっても同じ効果が得られるかを確認した。カルシウムを静脈内に投与すると、血管平滑筋を収縮し血圧が上昇するため、中枢での降圧反応を確認することができない。そこで、カルシウムブロッカー剤によって、血管平滑筋の収縮を抑制しながら中枢の降圧反応を観察した。

ラットの静脈内にカルシウムブロッカー剤を投与すると、一時的な血圧の降下が見られる。この効果は、カルシウムの静脈内前投与によって増加し、カルシウムの効果は、脳室内に前投与したカルシウムキレート剤によって抑制される（図２）。この結果より、血中のカルシウムの一部は直接血管に作用し血圧を高めるが、一部は脳内に移行し、ドーパミンの作用を介して血圧を降下させる事が示唆される[9]。前者は急性反応であり、後者は慢性的な反応である。

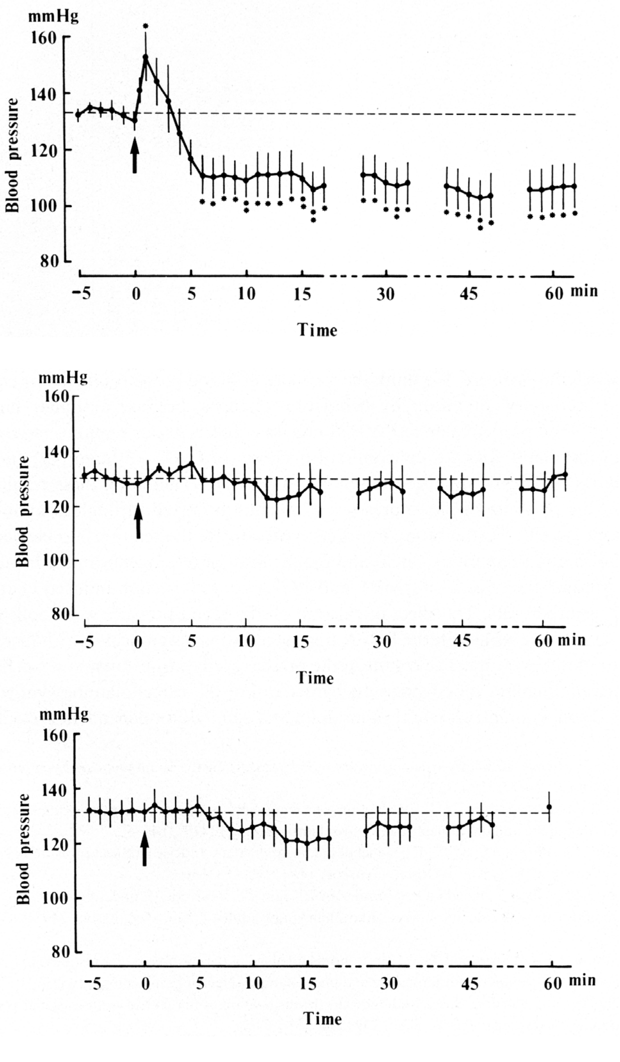


図１．覚醒ラットの平均動脈圧に対する
カルシウムの脳室内投与の効果

塩化カルシウム (30 μmol/kg) の側脳室への投与によって、一過性の昇圧反応と１時間以上に渡る持続した有意な降圧反応がみられる（上）。このカルシウムの効果は、カルモジュリン拮抗剤の同時投与（中）や、タイロシン水酸化酵素阻害剤の前投与（下）によって消失する。

↑: カルシウム投与点、*p<0.05; **p<0.01、カルシウム投与前と比較 (Student's *t*-test)。(Sutoo *et al.*, 1987) [6]

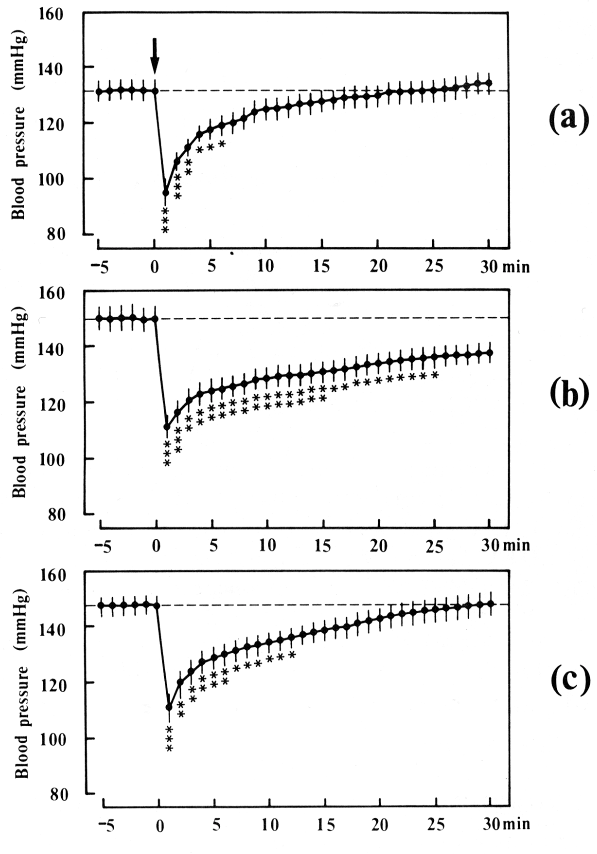


図２．覚醒ラットの平均動脈圧に対する
カルシウムブロッカー剤の静脈内投与の効果

上：カルシウムブロッカー剤 (Verapamil, 300 μg/kg) の静脈内投与によって、有意な降圧反応がみられる。

中：一時間前に塩化カルシウム (300 μmol/kg) を静脈内投与したラットでは、カルシウムブロッカー剤による降圧反応が、約４倍持続する。

下：５分前にカルシウムキレート剤を脳室内に投与すると、カルシウムの静脈内投与の効果は半減する。

↓: カルシウムブロッカー剤投与点、*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001、カルシウムブロッカー剤投与前と比較 (Student's *t*-test)。(Sutoo *et al.*, 1988) [9]

図３. SHR の 骨カルシウム分布

13 週齢の自然発症高血圧ラット(SHR)と母系の WKY を X 線撮影し、得られたフィルムを Brain Mapping Analyzer によって定量的に解析した。SHR は、WKY と比較して全身に渡って骨カルシウムレベルが高い。
(Sutoo *et al*., 1993) [10]

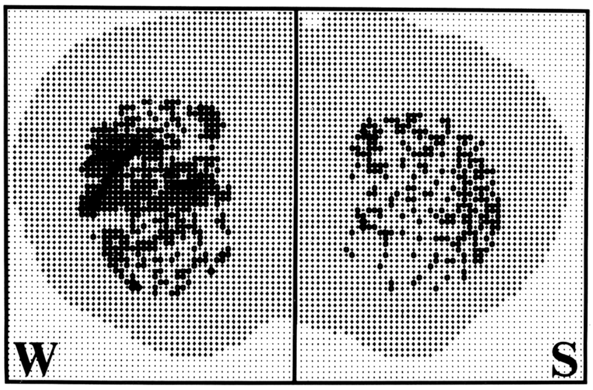


図４. SHR の 脳内ドーパミン分布

13 週齢の自然発症高血圧ラット(SHR)と母系の WKY を灌流固定し、脳切片をドーパミンに対する抗体によって免疫組織化学的に染色した。各切片を Brain Mapping Analyzer によって定量的に解析した。SHR の線条体と側坐核で有意なドーパミンの減少が確認される。
(Sutoo *et al*., 1993) [10]

５. 高血圧症モデル動物の解析

高血圧症のモデル動物として広く知られている自然発症高血圧ラット(SHR)のカルシウム依存性ドーパミン合成系に関与する種々の物質を分析した。

母系の健常ラット(WKY)に比べ、SHR は骨カルシウムレベルが有意に高く（図３）、逆に血清カルシウムレベルが低い。この事が、中枢へのカルシウムの供給を減少させ、脳内のカルモジュリン依存性ドーパミンの合成を低下させていると示唆される。実際、SHR の線条体と側坐核のドーパミンレベルは、WKY に比べ有意に低く（図４）、カルシウムの脳室内投与によって改善される。これが、SHR にみられる高血圧症の発症原因の一つと考えられる[10,11]。

表１. ラットの収縮期血圧に対するカルシウムの経口摂取の効果

Treatment		After administration (day)							
p.o.	i.c.v.	1	5	9	11	12	14	16	18
Water	Saline	7.9±4.7	6.0±4.3	9.2±6.1	9.0±5.6	6.3±5.1	10.0±6.6	7.7±4.8	6.8±4.6
Water	αMPT	−3.1±3.8	−5.1±4.1	−6.7±5.2	−5.7±5.0	−5.8±4.5	−4.4±4.4	−3.3±3.5	−5.1±4.4
$CaCl_2$	Saline	2.5±3.4	1.4±3.3	−19.7±5.1 [b]	−26.7±4.9 [b]	−29.6±4.2 [b]	−35.7±4.2 [b]	−44.9±4.0 [b]	−50.9±5.6 [b]
$CaCl_2$	αMPT	3.3±3.1	4.1±3.4	−4.8±4.6	−13.3±5.3 [a]	−25.8±6.4 [b]	−28.1±5.8 [b]	−31.0±5.1 [bc]	−30.1±5.4 [bd]

飲料水として 1.5% 塩化カルシウム溶液を摂取させると、９日目から有意に血圧が降下する。カルシウムの効果は、タイロシン水酸化酵素阻害剤(αMPT)の脳室内投与によって抑制される。各血圧値は、投与前の血圧を差し引いた値を示している。[a] $p<0.05$; [b] $p<0.01$、 water + 生理食塩水（saline）投与群と比較 ; [c] $p<0.05$; [d] $p<0.01$、$CaCl_2$+ saline 投与群と比較（Newman-Keuls *t*-test）。(Sutoo *et al*., 1990) [12]

６. 高カルシウム食による血圧調節

ラットに、慢性的に高カルシウム飲料水を与えると、９日目から有意に血圧が降下する。このカルシウムの効果は、カテコルアミンの合成酵素阻害剤の脳室内投与によって抑制される（表１）。さらに、カルシウムの腹腔内投与によっても同様な降圧反応がみられる。この結果より、経口或いは腹腔内から慢性的に投与したカルシウムも、脳室内及び静脈内に投与した場合と同様に中枢ドーパミンの合成を高め、徐々に血圧を降下させることが示唆される[12]。

最近、各国で高カルシウム食によって高血圧症を予防・治療する試みが始まっている[7]。軽度の高血圧患者に高カルシウムを含有する菜食を与えると血圧が降下し、肉食を再開すると再び血圧が上昇することが報告されている。さらに、牛乳の摂取量と血圧には負の相関があり、毎日牛乳を摂取すると血圧が降下することが報告されている。

７．まとめ

血圧調節において、カルシウムは対立する二つの作用を持つ。一つは、末梢の血管平滑筋を介した昇圧作用であり、もう一つは、中枢のカルシウム依存性ドーパミン合成系を介した降圧作用である。この降圧作用のメカニズムは以下のように考えられる。食事などによって血中カルシウムが少しずつ増加しても、血管を刺激する濃度ではないので収縮させない。増加した血中カルシウムの一部は脳内へ移行し、カルモジュリン依存系を介してドーパミンの合成を亢進する。レベルの高くなったドーパミンが D_2 レセプターを介して血圧調節中枢に作用し、末梢の交感神経系を抑制して血圧を降下させる（図５）[7]。

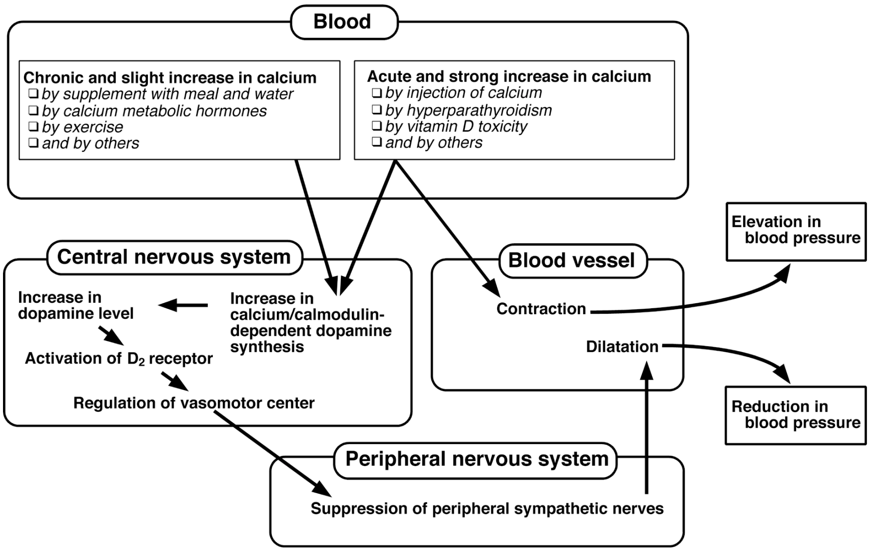


図５．カルシウムによる血圧調節のメカニズム (Sutoo *et al.*, 1997) [7]

参考文献

[1] D. Sutoo, K. Sano, Modulating effects of biogenic amines on calcium and ethanol-induced sleeping time, Alcohol 1 (1984) 141-144.
[2] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Iimura, Effect of calmodulin antagonists on calcium and ethanol-induced sleeping time in mice, Pharmacol. Biochem. Behav. 23 (1985) 627-631.
[3] D. Sutoo, K. Akiyama, M. Geffard, Central dopamine-synthesis regulation by the calcium-calmodulin-dependent system, Brain Res. Bull. 22 (1989) 565-569.
[4] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, Comparison analysis of distributions of tyrosine hydroxylase, calmodulin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a triple stained slice of rat brain, Brain Res. 933 (2002) 1-11.
[5] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, Quantitative mapping analyzer for determining the distribution of neurochemicals in the human brain, J. Neurosci. Methods 85 (1998) 161-173.
[6] D. Sutoo, T. Matsukura, K. Akiyama, Effect of intraventricular administration of calcium and calmodulin antagonist on the blood pressure in the rat, Neurosci. Lett. 82 (1987) 297-302.
[7] D. Sutoo, K. Akiyama, Regulation of blood pressure with calcium-dependent dopamine synthesizing system in the brain and its related phenomena, Brain Res. Rev. 25 (1997) 1-26.
[8] D. Sutoo, K. Akiyama, Effect of dopamine receptor anatagonists on the calcium-dependent central function that reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats, Neurosci. Lett. 269 (1999) 133-136.
[9] D. Sutoo, T. Matsukura, K. Akiyama, The mechanism by which calcium reduces blood pressure, Eur. J. Pharmacol. 155 (1988) 189-192.
[10] D. Sutoo, K. Akiyama, T. Matsukura, R. K. Nakamoto, Decrease of central dopamine level in the adult spontaneously hypertensive rats related to the calcium metabolism disorder, Brain Res. Bull. 30 (1993) 107-113.
[11] K. Akiyama, D. Sutoo, Rectifying effect of exercise on hypertension in spontaneously hypertensive rats via a calcium-dependent dopamine synthesizing system in the brain, Brain Res. 823 (1999) 154-160.
[12] D. Sutoo, T. Matsukura, K. Akiyama, Reduction of blood pressure with calcium supplementation, Eur. J. Pharmacol. 183 (1990) 1313-1314.

人脳内に分布する神経伝達物質の定量的解析法の開発

矢部一徳[1]、秋山佳代[2]、須藤伝悦[3]
筑波大学人間総合等教育研究支援室（医学系）
〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

私共は、小動物の脳内神経伝達物質の分布を全領域に渡り、細胞レベルで定量的に分析する方法を開発してきた[1-8]。更に、この方法を基に人脳を分析するための Human Brain Mapping Analyzer を開発し[9]、様々な神経伝達物質やその関連物質の分布を解析してきた[9-16]。今回、その中から人脳を定量分析するための検体の処理方法、標本の作製法、自家蛍光の除去法及び得られた分析結果について報告する。

１．はじめに

神経系の情報伝達は、シナプスにおける神経伝達物質の授受によって行なわれている。従って、脳内の各部位における神経伝達物質の分布を分析する事は、中枢機能を解明する上で、さらに種々の疾病の発症機序を解明する上で極めて重要である。従来の研究は、主に生化学的方法と免疫組織化学的方法によって行なわれてきた。生化学的方法は物質量や活性値を定量するのに優れているが、試料採取と前処理操作での誤差をはじめ、分析感度や物質の死後変性による誤差等によって、正確で詳細な定量値を得ることが困難であった。一方、免疫組織化学的方法では、活性物質の抗体に対する免疫性は死後比較的長い時間安定しており、各物質の分布を細胞レベルで詳細に、しかも正確に識別することが可能である。しかし、それらを定量的に分析するのに良い方法がなかった。テレビカメラを使用した画像解析装置では、直線性、再現性、感度などの点において問題がある。また、レーザーコンフォーカル顕微鏡はマクロ標本の分析には使用できない。

私共は、小動物の脳標本を蛍光免疫組織化学的に染色し、その蛍光強度の分布を細胞レベルで定量する Brain Mapping Analyzer を開発し[1]、種々の脳内神経化学物質の分布を分析してきた[1-8]。この分析法は、テレビカメラを用いた画像解析法や電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー法と比べて、少なくとも 4 桁以上微細で正確な分析結果を得ることができる。さらに、この装置を基に、人脳内に分布する神経化学物質を分析するための Human Brain Mapping Analyzer とその解析法を開発した[9]。この装置によって、人脳の切片全面を数ミクロン毎に数百万領域に分割して様々な神経化学物質の分布を分析し、定量的に画像化できる他、各領域の蛍光強度値を抽出して統計処理することができる。

本報告では、この装置を利用して人脳を定量分析するための検体の処理方法、標本の作製方法、免疫組織化学染色法、非特異的な自家蛍光の消去法、並びに得られた分析結果について報告する。

２．標本の作製法

本実験では、神経病歴及び精神病歴を持たない 3 体の男性（50-70 歳）の脳を使用した。これらはいずれも筑波大学に医学教育・研究のために遺族より献体として提供されたものである。定量分析を行うためには、組織を細部まで均一に完全に固定しなければならない。小動物を用いた実験では、全身に固定液を灌流し、その後脳を取り出していた。しかし、人の全身を固定するには固定液が大量に必要である上、死後時間が経過しているために脱血、固定がうまくいかない可能性がある事などから、脳を取り出した後に注入固定を行なった。免疫反応性には死後時間も関係してくることから、死後８時間以内の脳を用いた。

2.1 人脳の固定

脳はできる限り血管を傷つけないよう硬膜を付けた状態で取り出した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) で満たしたバットにガーゼを張り、その上に、脳を裏返して置いた。両側の内頚動脈及び脳底動脈にカニューレを挿入し、ペリスタポンプを用いて PBS（2ℓ）を毎分約 65 ml の速度で注入して脱血した。続いて 4%パラホルムアルデヒドと 0.2%グルタルアルデヒドを含む PBS 溶液（6ℓ）によって注入固定を行なった。脳の硬膜をはずし、前額断の厚さ 1cm のブロックに分割し、4%パラホルムアルデヒドの PBS 溶液（4℃）で 2 日間、後固定を行なった。さらに脳ブロックを PBS 溶液（4℃）で 3 日間洗浄し、5%ショ糖 PBS 溶液（4℃）に 4 日間浸漬した。ショ糖液を浸透させることによって、凍結時に組織内の氷の発生を抑制し、組織の損傷を防ぐことができる。各脳ブロックの軟膜と血管を丁寧に取り除き、ドライアイス上で急速に凍結させ、乾燥を防ぐため密封して-80℃で保存した。

2.2 標本薄切

本研究では前額断ブロックを左右半球に半切し使用した。脳ブロックを解凍し 13%ポリビニルアルコールを含む PBS 溶液に包埋し、再び凍結した。続いて、大型の凍結切片用ミクロトーム (Cryo-Microtom, PMV, Sweden) を用いて 20 μm の厚さで連続的に薄切した。薄切した標本を PBS 溶液上に浮かべてしわを伸ばし、水溶性のポリビニルアルコールを除去し、

[1] E-mail: yabek@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3231
[2] E-mail: akiyamak@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3330
[3] E-mail: dsutoo@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3113

スライドガラス (75 x 150 mm) に張り付けた。スライドガラスには標本のはがれを防止するため、予めゼラチン-クロム明礬溶液（ゼラチン 0.5%, クロム明礬 0.1%）でコーティングを施した。

３．非特異的自家蛍光の消去法

高齢の人脳、特に白質のミエリン内には、若齢のラットやマウスには見られない、リポフスチン等に由来する非特異的な自家蛍光が存在する。そのため、従来の蛍光免疫組織化学的な分析法では人の脳を直接分析することは困難であった。そこで、人脳の自家蛍光を除去するために幾つかの方法を試みた。

3.1 化学反応による消去法

(1) 有機溶媒による溶解：エタノール、メタノール又はクロロホルムに標本を 30 分間〜24 時間浸した。(2) 酸、アルカリによる遊離・溶解：1N 塩酸に 10 分間、或いは 0.1N 水酸化ナトリウム溶液に 5 分間浸した。(3) 酸化・還元処理： i) 0.25% 過マンガン酸カリウム ($KMnO_4$) に 20 分間浸した後、蒸留水で洗浄し、Pal 溶液（1%亜硫酸カリウムと 1%シュウ酸の混合液）に 1〜2 分間浸し、PBS で洗浄した。ii) 過酸化水素水に 2〜3 分間浸した。iii) 水素化アルミニウムリチウム溶液又は水素化ホウ素ナトリウム溶液に 10 分間浸した。(4) 酸化漂白反応：デシケーター内で脳標本の水分を十分に除去し、飽和塩素ガスに 2 週間曝した。デシケーター内のガスを十分に吸引した後、標本を無水エタノールに 10 分間浸し、PBS で洗浄した。各処理後、非特異的蛍光物質の有無を Human Brain Mapping Analyzer で測定した。

3.2 光学的手法による消去法

顕微蛍光分光光度計 (SPM-RFL, Nikon) によって、人脳の非特異的蛍光物質のスペクトルを分析し、励起波長及び干渉フィルターを調節することによる消去法を検討した。

3.3 二重測光法による消去法

未染色の脳標本を PBS で 2 時間洗浄し、水溶性の蛍光物質を取り除き、Human Brain Mapping Analyzer で各脳領域における非特異的な蛍光強度を測定した。続いて、切片を蛍光免疫組織化学的に染色し、装置の同一座標にセットし、同一条件下で再び測定した。免疫反応後の蛍光強度値より反応前の値を差し引き、純粋な免疫組織化学的蛍光強度値を求めた（図１）。同一座標に標本をセットする際、スライドガラスの三端にガラスペンで特定の３点をマークして、二度目の測定の目印とした。

４．蛍光免疫組織化学染色

目的の抗体を用いてイソチオシアン酸フルオレセイン(FITC)ラベルの２抗体法によって、蛍光免疫組織化学的に染色した。各抗体の濃度は、予備実験から決定した。免疫組織化学染色の操作手順を以下に示す。(1) 標本を PBS で 2 時間洗浄した。(2) 標準血清を切片にのせ、4℃で 2 時間反応させた後、PBS で 1 時間洗浄した。(3) 各物質に対する抗体（第１抗体）を 1.2 ml 切片にのせ、4℃で 12 時間反応させた。(4) PBS で 30 分ずつ 3 回洗浄した。(5) FITC で標識化された第２抗体を切片にのせ、アルミホイル

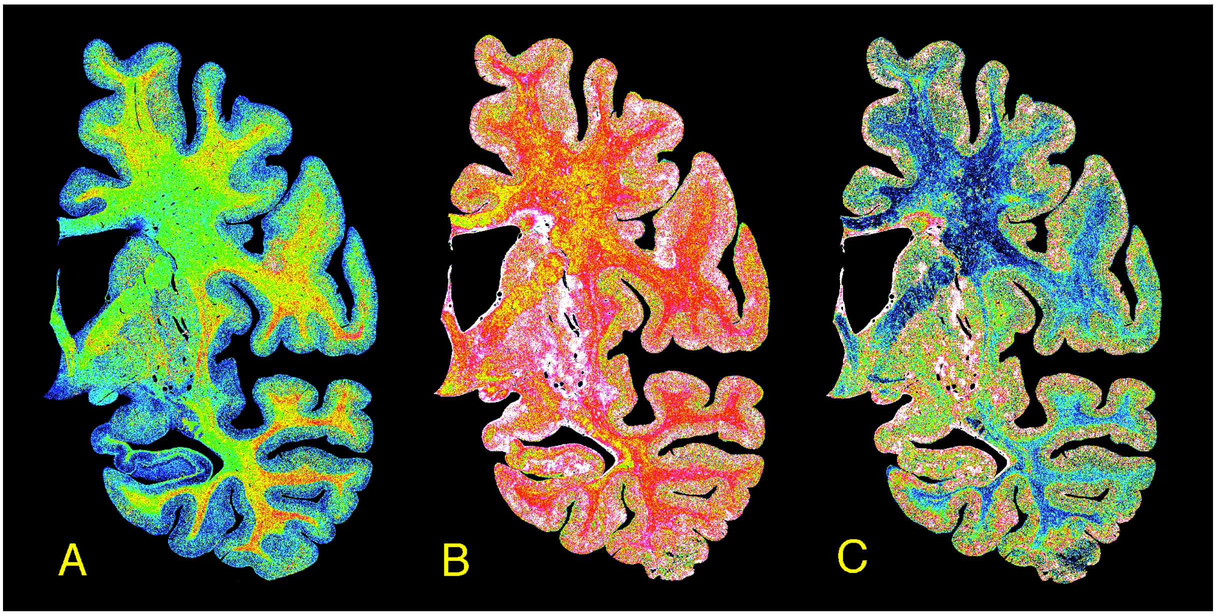


図１． 人脳切片に見られる非特異的蛍光の除去法

人脳にはリポフスチンなどに起因する非特異的な蛍光物質が分布しており、蛍光免疫組織化学的に染色した標本から目的とする物質の分布を直接得ることはできない。コリンアセチル基転移酵素（ChAT）の分析を例に、その除去方法を示す。染色前（A）と染色後（B）に同一条件下で各領域の蛍光強度を測定し、その差より純粋な ChAT の蛍光強度値（C）を求めた。

A：人脳切片における非特異的自家蛍光の強度分布図

B：ChAT 抗体による免疫組織化学染色後の蛍光強度分布図。免疫組織化学染色と自家蛍光の分布が混合している。

C：純粋な ChAT の蛍光強度の分布図。B に示したデータから A に示したデータを差引くことによって得られる。

(*J. Neurosci. Methods* **85:** 161-173, 1998 より引用)

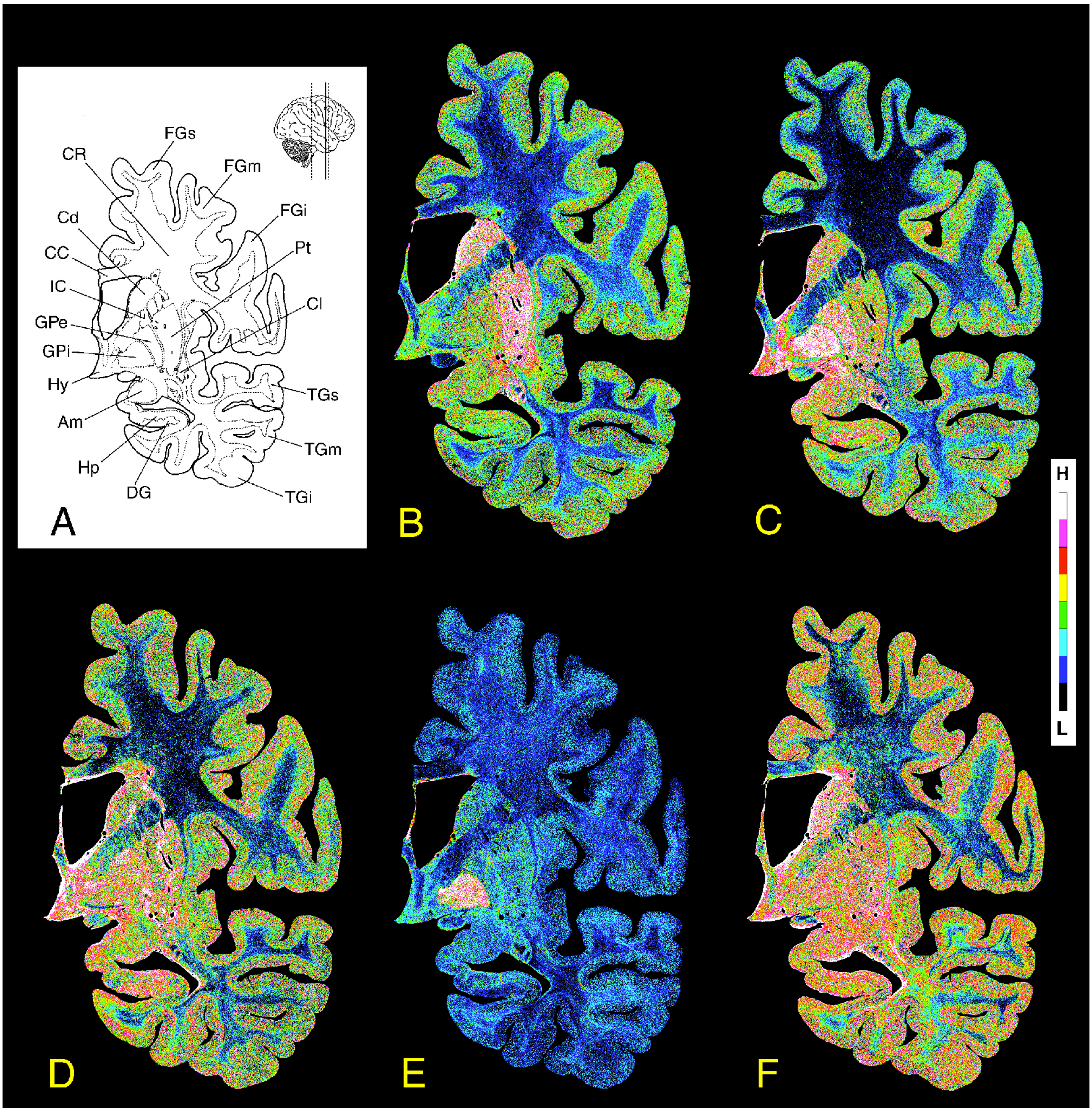


図２．正常な人脳における様々な神経化学物質の分布図の一例

染色した脳標本を Human Brain Mapping Analyzer を用いて、50 μm間隔で約 300 万領域に分割し、各領域における蛍光強度値を測定した。得られたデータを 8 段階の強度に分類し、カラー表示した。

A：分析した脳切片の部位；右上の挿入図に私共が分析した領域を点線で示した。ここに示したデータの切断面は実線で示した。Am, 扁桃；CC, 脳梁；Cd, 尾状核；Cl, 前障；CR, 放射冠；DG, 歯状回；FGi, 前頭葉下前頭回；FGm, 前頭葉中前頭回；FGs, 前頭葉上前頭回；GPe, 淡蒼球外節；GPi, 淡蒼球内節；Hp, 海馬；Hy, 視床下部；IC, 内包前脚；Pt, 被殻；TGi, 側頭葉下側頭回；TGm, 側頭葉中側頭回；TGs, 側頭葉上側頭回

B：タイロシン水酸化酵素 (TH) の免疫組織化学的分布図
C：グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の免疫組織化学的分布図
D：グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) の免疫組織化学的分布図
E：サブスタンス P (SP) の免疫組織化学的分布図
F：カルモジュリン (CaM) の免疫組織化学的分布図
(B&F: *J. Neurosci. Res.* **63:** 369-376, 2001; C&D: *Human Brain Mapping* **11:** 93-103, 2000; E: *Neurosci. Res.* **35:** 339-346, 1999 より引用)

で遮光し、室温で 3 時間反応させた。以後の操作は全て遮光下で行なった。(6) PBS で 3 時間ずつ 6 回洗浄した。(7) 10%グリセリン PBS 溶液で封入した。標本を 4℃の暗所に保管し、直ちに分析した。蛍光免疫組織化学染色の際に、ラットの脊髄切片を人脳標本と同時に染色し、染色条件の指標とした。蛍光免疫組織化学染色された標本は、暗所低温下で一週間は安定である。

５．定量分析

分析には Human Brain Mapping Analyzer [9]を用いた。この装置は落射蛍光顕微鏡のカメラマウントに高感度の光電子増倍管をセットしてあり、ピンホールを通して、標本の微細な領域からの特定な蛍光強度を計測する装置である。顕微鏡のステージはコンピューターで制御されており、標本全面の蛍光強度の分布を細胞レベルで一度に分析できる。ステージの最大可動範囲は 150 x 150 mm、最小測光間隔は 0.25 µm、測光スピードは 100 領域／秒である。

測定条件： 励起波長 420-490 nm, 干渉フィルター 530 nm, 光電子増倍管の印加電圧 850 V, 対物レンズ 20 x / 0.5 (倍率/開口数), 測光間隔 50 µm, 視野絞り 40 µm, 測光絞り 100 µm。本研究では、1 枚の脳標本から約 300 万領域のデータを得た。得られた蛍光強度値を 8 段階にカラー表示し、各物質の分布を解析した。ウランガラスを蛍光強度のスタンダードとして使用した。

６．結果と考察

高齢の人脳にはリポフスチン等に由来する自家蛍光が存在するため、小動物の脳標本のように直接、分析することが出来ない。非特異的自家蛍光は、有機溶媒、酸・アルカリ、過酸化水素水による酸化処理、水素化アルミニウムリチウムや水素化ホウ素ナトリウムによる還元処理では、ほとんど消去できなかった。過マンガン酸カリウムによる酸化処理は、非特異的自家蛍光の強度を約 50 % 減少させたが、組織標本が痛み、免疫組織化学染色に使用する事ができなかった。塩素ガスによる酸化漂白反応は自家蛍光の強度を約 90 % 減少させたが、再現性に問題があった。さらに、自家蛍光は広い波長領域の励起光で励起され、発せられる蛍光も広い波長領域に渡るため、励起波長の選択や干渉フィルターによって、免疫組織化学的蛍光と自家蛍光を分離することはできなかった。

そこで、Human Brain Mapping Analyzer を用いて免疫組織化学染色前後に同一条件下で同じ部位の蛍光強度を 2 回測光し、反応後の値から反応前の値を差し引く二重測光法を用いて純粋な蛍光強度値を得た。この方法は、化学的反応を用いた消去法と異なり、蛍光の退色や組織標本の痛みもほとんど無く、最も正確で再現性があった（図１）[9]。この方法によって得られた各物質の純粋な蛍光強度の分布を図１及び図２に示している。

コリンアセチル基転移酵素（アセチルコリンの合成酵素，ChAT）[9,10]、タイロシン水酸化酵素（カテコルアミンの合成酵素，TH）[10,16]、グルタミン酸脱炭酸酵素（GABA の合成酵素，GAD）[14]、グルタミン酸脱水素酵素（グルタミン酸のレベルを調節する酵素，GDH）[14]、サブスタンス P (SP) [13] 及びカルモジュリン (CaM) [16] の分析の結果、それぞれの物質は脳領域に依存して分布しており、各物質の分布には差異がみられた。特に、尾状核、被殻及び淡蒼球などの領域で物質間に特徴的な分布が観察された。ChAT は、被殻、尾状核、淡蒼球、扁桃、前障などの領域に高レベルで分布していた。TH は尾状核と被殻で特に高い分布が見られた。GAD のレベルは淡蒼球と視床下部で最も高く、淡蒼球の外節よりも内節に高い分布が見られた。GDH は灰白質全体に比較的均一に分布していたが、被殻、尾状核、淡蒼球、視床下部などに高レベルで存在した。SP は淡蒼球の内節にのみ高レベルで局在していた。CaM は灰白質の全ての領域で比較的高い分布を示したが、尾状核と被殻のレベルが最も高かった。本法によって得られた結果は以前の生化学的な結果及び組織化学的観察結果と対応しており、正確な分布と定量値を細胞レベルで得ることができた。

今回確立した分析方法は、従来の方法と比較して著しく安定した正確な結果が得られる。こうして得られる分析結果は、中枢機能の解明や種々の神経疾患の発症機序解明のための基礎的データを提供するものである。

参考文献

[1] 須藤伝悦，秋山佳代，前田一郎．脳内神経伝達物質分布分析のための顕微測光装置システムの開発，日本薬理学雑誌 91 (1988) 173-180.

[2] D. Sutoo, K. Yabe, K. Akiyama, Atlas of the rat brain: quantitative distribution of the choline acetyltransferase, Kitasato Arch. Exp. Med. 64 (1991) 221-262.

[3] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, K. Kohno, Multiple analysis of tyrosine hydroxylase and calmodulin distributions in the forebrain of the rat using a microphotometry system, Brain Res. Bull. 26 (1991) 973-982.

[4] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, N. Nishida, Quantitative immunohistochemical distribution of choline acetyltransferase in the rostral forebrain of the rat, Neurosci. Res. 11 (1991) 63-70.

[5] K. Akiyama, K. Yabe, D. Sutoo, Quantitative immunohistochemical distributions of tyrosine hydroxylase and calmodulin in the brains of spontaneously hypertensive rats, Kitasato Arch. Exp. Med. 65 (1992) 199-208.

[6] M. Hanawa, T. Asano, K. Akiyama, K. Yabe, K. Tsunoda, T. Tadano, D. Sutoo, Effect of Zena F-III, a liquid nutritive and tonic drug, on the neurochemical changes elicited by physical fatigue in mice, Pharmacol. Biochem. Behav. 66 (2000) 771-778.

[7] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, A novel technique for quantitative immunohistochemical imaging of various neurochemicals in a multiple-stained brain slice, J. Neurosci. Methods 118 (2002) 41-50.

[8] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, Comparison analysis of distributions of tyrosine hydroxylase, calmodulin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a triple stained slice of rat brain, Brain Res. 933 (2002) 1-11.

[9] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, Quantitative mapping analyzer for determining the distribution of neurochemicals in the human brain, J. Neurosci. Methods 85 (1998) 161-173.

[10] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, K. Kohno, Quantitative analysis of immunohistochemical distributions of cholinergic and catecholaminergic systems in the human brain, Neuroscience 58 (1994) 227-234.
[11] K. Yabe, D. Sutoo, K. Akiyama, K. Kohno, Quantitative immunohistochemical distributions of some neurotransmitters and related enzymes in the human brain, XIIth International Congress of Pharmacology (Montréal, Canada), 1994.
[12] K. Yabe, K. Akiyama, D. Sutoo, Quantitative immunohistochemical distributions of various neurochemicals in the human brains, XIIIth International Congress of Pharmacology (München, Germany), 1998.
[13] D. Sutoo, K. Yabe, K. Akiyama, Quantitative imaging of substance P in the human brain using a brain mapping analyzer, Neurosci. Res. 35 (1999) 339-346.
[14] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, Quantitative maps of GABAergic and glutamatergic neuronal systems in the human brain, Human Brain Mapping 11 (2000) 93-103.
[15] D. Sutoo, K. Yabe, K. Akiyama, Quantitative distribution of various neurochemicals in the human brain using a human brain mapping analyzer, In: T. Kato (Ed.), Frontiers of the Mechanisms of Memory and Dementia, Elsevier, Amsterdam, 2000, pp. 45-46.
[16] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, Quantitative imaging of tyrosine hydroxylase and calmodulin in the human brain, J. Neurosci. Res. 63 (2001) 369-376.

ヒト赤血球および白血球の補体制御膜蛋白発現のフローサイトメトリーによる検討

佐藤晶子
筑波大学人間総合等教育研究支援室（医学系）
〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

赤血球および白血球の補体制御膜蛋白（CD55、CD59）の発現について、健常人・骨髄異形成症候群（MDS）・発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）においてフローサイトメトリー (FCM) による測定を試みた。

PNH においては、健常人や MDS と異なり、赤血球・好中球・単球・リンパ球の補体制御膜蛋白の欠損を検出することができた。また、グリコシルフォスファチジルイノシトール（GPI）アンカー膜蛋白に属する CD16ｂや CD14、CD24 についても分析を行い、PNH においては同様に発現量低下の異常細胞を検出し得た。

この FCM による測定法は、PNH の総合的病態診断法の 1 つになると考えられた。

１．はじめに

筑波大学血液内科では、PNH の赤血球補体制御膜蛋白の解析を、「FCM の two-color 分析」により行っており、筑波大学付属病院は高度先進医療の認定を受けている。今回はこれを発展させ、赤血球だけでなく白血球の補体制御膜蛋白（CD55、CD59）の発現について、健常人・MDS・PNH において FCM による測定を行い比較検討した。

PNH は、多能性造血幹細胞レベルにおける遺伝子（PIG-A 遺伝子）異常により発症する後天性のクローナル疾患で[1,2]、各種血球の GPI アンカー蛋白の膜上での発現が障害され、多彩な臨床症状を呈することが知られている[1,3]。PNH は、骨髄不全症候群の側面[4]と慢性溶血性貧血の病態[1]を持ち、正常赤血球では、補体制御膜蛋白を発現することにより、補体活性化による溶血を防御しているが、PNH 赤血球では、この欠損のため補体感受性が亢進し血管内溶血がおきる。

CD55 や CD59 などの補体制御膜蛋白は、GPI アンカー膜蛋白に属しており、今回は、赤血球と白血球における補体制御膜蛋白測定に加え、GPI アンカー膜蛋白の CD16ｂや CD14、CD24 についても分析を試み、末梢血による異常細胞の検出を試みた。

２．対象および測定方法

EDTA またはクエン酸ナトリウム採血による末梢血液を用いて、健常人 (n=5) 、MDS (n=4) 、PNH (n=2) の測定を試みた。測定は、FACSort（Becton Dickinson）で行い、CELL Quest で解析した。

2.1 使用抗体

・抗 CD55-FITC 標識抗体 (JS11KSC2.3 (IgG1) ; Immunotech)
・抗 CD59-FITC 標識抗体 (p 282 (H19) (IgG2a) ;BD Biosciences)
・抗 CD3-PE 標識抗体 (PC3/ 188A (IgG1) ; Dako Cytomation)
・抗 CD13-PE 標識抗体 (WM-47 (IgG1) ; Dako Cytomation)
・抗 CD14-FITC 標識抗体 (TUK4 (IgG2a) ; Dako Cytomation)
・抗 CD16b-FITC 標識抗体 (1D3 (IgM) ; Immunotech)
・抗 CD19-PE 標識抗体 (HD37 (IgG1) ; Dako Cytomation)
・抗 CD24 抗体 (ML5 (IgG2a) ; Phar Mingen)

2.2 赤血球 (RBC) による測定

１．小試験管に末梢血液 500μl を入れ、ステイニング メディウム（SM）(phosphate-buffered saline (ph7.2) (PBS:日水製薬) , 0.1%bovine serum albumin (sigma) , 0.1% NaN_3) 4ml を加え 1000 rpm , ５分間遠心し１回洗浄。沈渣に SM を加えて、RBC 浮遊液を調整。
２．フィッシャーチューブに 50μl ずつ (1×10^6 個 RBC) 細胞を分注し抗体を加え、室温で 30 分間遮光して反応。
３．SM 300μl で２回洗浄し、SM 300μl に再浮遊させ、小試験管に移し FCS で測定、解析。

2.3 白血球 (WBC) による測定

１．末梢血液 5ml を 1000 rpm , 5 分間遠心し、buffy coat を回収。赤血球除去のために蓚酸アンモニウム溶液を加えて溶血させ、ＳＭで１回洗浄。沈渣に SM を加えて、WBC 浮遊液を調整。
２．フィッシャーチューブに、50μl ずつ（2.5×10^5WBC）細胞を分注し、抗体を混ぜて 4℃で 30 分間遮光して反応。
３．SM 300μl で２回洗浄し、SM 300μl に再浮遊し、小試験管に移し FCS で測定。細胞識別のため、FSC/SSC の解析と好中球･単球では抗 CD13 抗体、B リンパ球では抗 CD19 抗体、T リンパ球では抗 CD3 抗体との二重染色を行い解析を試みた。また、各細胞の陽性率は、アイソタイプコントロール抗体により陰性対照を求め、陽性領域のカットオフ値を設定した。

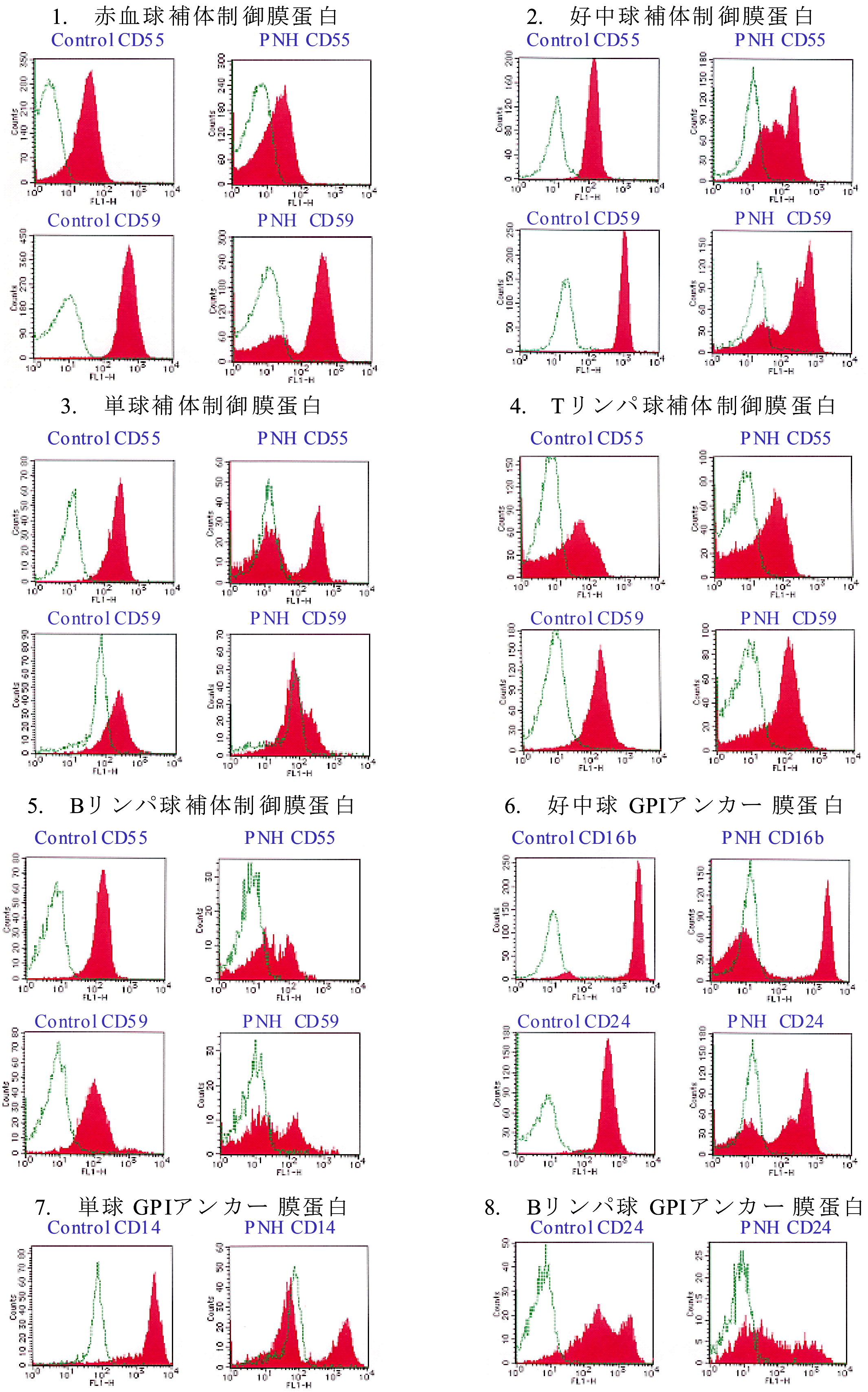


図1.　健常人とPNHにおけるFCMによるGPIアンカー膜蛋白測定の１症例（点線：陰性対照）

３．測定結果

3.1 赤血球補体制御膜蛋白測定

健常人赤血球 CD59 では、 平均陽性率は 99.9±0.1%で、陰性対照と比較し平均発現蛍光量は高値を示した。一方、赤血球 CD55 では、平均陽性率 86.9±8.2%となり、蛍光強度は CD59 より低く一部陰性対照と重なるパターンであった（図 1）。

MDS における平均陽性率は、CD55＝89.0±3.1% および CD59＝９９.９±0.1%であり(図 2)、蛍光強度も健常人赤血球とほぼ同様であった。

PNH においては、CD55 および CD59 ともに健常人と同等の発現量をもつ赤血球のほかに、発現欠損の異常赤血球を認め（図 1）、健常人や MDS に比べて陽性率は低値であった(図 2)。

3.2 好中球補体制御膜蛋白測定

健常人好中球 CD55 の平均陽性率は 99.8±0.2%、CD59 は 99.9±0.2%であった。また、平均蛍光強度は、CD55 と CD59 共に高値を示したが、CD59 の方がやや高い蛍光値であった（図 1）。

MDS における平均陽性率は、CD55＝100.0±0.1% および CD59＝９９.９±０.３%であり(図 2)、蛍光強度も健常人と同様に高値であった。

PNH においては、CD55 および CD59 ともに健常人と同等の発現量をもつ血球のほかに、発現量の低下および完全欠損の異常血球群を認め（図 1）、健常人や MDS に比べて陽性率は低値を示した(図 2)。

3.3 単球補体制御膜蛋白測定

健常人単球 CD55 の平均陽性率は 99.0±0.8%で、発現蛍光量も高値を示した。一方、単球 CD59 の発現量は高いものの陰性対照の蛍光量が強く、一部陰性対照の蛍光と重なるパターンになり(図 1)、その平均陽性率は 69.7±16.1%であった。

MDS における単球 CD55 の平均陽性率は 99.１±0.8%で蛍光強度も高値を示し、CD59 の発現パターンは健常人と同じように一部陰性対照と重なり平均陽性率 77.5±7.0%、発現量も健常人範囲内であった(図 2)。

PNH においては、CD55 および CD59 ともに、健常人と同様の発現血球のほかに完全欠損血球が検出され（図 1）、健常人や MDS と異なり多数の異常細胞を認めた(図 2)。

3.4 T リンパ球補体制御膜蛋白測定

健常人 T リンパ球 CD59 の平均陽性率は 95.9±2.3%、平均発現蛍光量も高値を示した。一方 CD55 では、CD59 より平均蛍光強度が低く陰性から陽性まで広く分布するパターンを呈し(図 1)、発現率は 52.9±12.2%であった。

MDS における T リンパ球の平均陽性率は、CD55＝62.0±2.4% および CD59＝９7.0±2.1%であり、蛍光強度も健常人と同様に健常人の範囲内であった(図 2)。

PNH においては、CD55 は健常人パターンに相似しており（図 1）、発現低下血球は著明ではなかった(図 2)。また CD59 は、健常人と同様の発現量を持つ血球とともに発現欠損の異常血球が検出され（図 1)、健常人や MDS に比べて陽性率は低値であった(図 2)。

3.5 B リンパ球補体制御膜蛋白測定

健常人 B リンパ球 CD55 の平均陽性率は 99.5±0.4%、CD59 の平均陽性率は 95.5±3.4%と共に高値であり（図 1）、平均発現蛍光量もほぼ同じ位の蛍光値であった。

MDS における B リンパ球の平均陽性率は、CD55＝98.8±0.8% および CD59＝９7.6±0.9% であり(図 2)、蛍光強度も健常人と同様のパターンであった。

PNH においては、CD55 および CD59 ともに健常人と同等の発現量を持つ血球のほかに、発現欠損の異常血球を多数認め（図 1）、陽性率は健常人や MDS に比べ低値を示した(図 2)。

3.6 好中球 (CD16b) の測定

健常人好中球の CD16ｂは、高い蛍光強度を示し（図 1）、平均陽性率は 96.5±3.8%であった。

MDS における好中球 CD16ｂの平均陽性率は、99.5±0.3%で(図 2)、蛍光強度も健常人と同様に高値であった。

PNH においては、健常人と同等の CD16ｂ発現血球のほかに、多数の発現欠損の異常血球を認め（図 1)、健常人や MDS に比べて陽性率は低値を示した(図 2)。

3.7 好中球 (CD24) の測定

健常人好中球 CD24 は、CD16ｂよりも蛍光強度は低いものの CD59 と同等の蛍光量を持ち（図 1）、平均陽性率は 99.8±0.1%と高値であった。

MDS における好中球 CD24 の平均陽性率は 99.3±1.0%で(図 2)、健常人とほほ同様のパターンであった。

PNH においては、健常人と同等の CD24 発現量を持つ血球のほかに、発現量の低下および完全欠損の異常血球群を認め(図 1)、陽性率は健常人や MDS に比べて低値を示した。

3.8 単球 (CD14) の測定

健常人単球 CD14 は、平均陽性率 85.2±9.5%で、陰性対照の蛍光強度が高いものであったが、それ以上に高い発現量を持つ細胞が観察され、解析上問題を認めなかった（図 1）。

MDS における単球 CD14 の平均陽性率は 86.8±7.8%で健常人の範囲内であった(図 2)。

PNH においては、健常人と同様の高発現血球のほかに発現欠損の異常血球を多数認め（図 1）、陽性率は健常人や MDS に比べて低値を示した(図 2)。

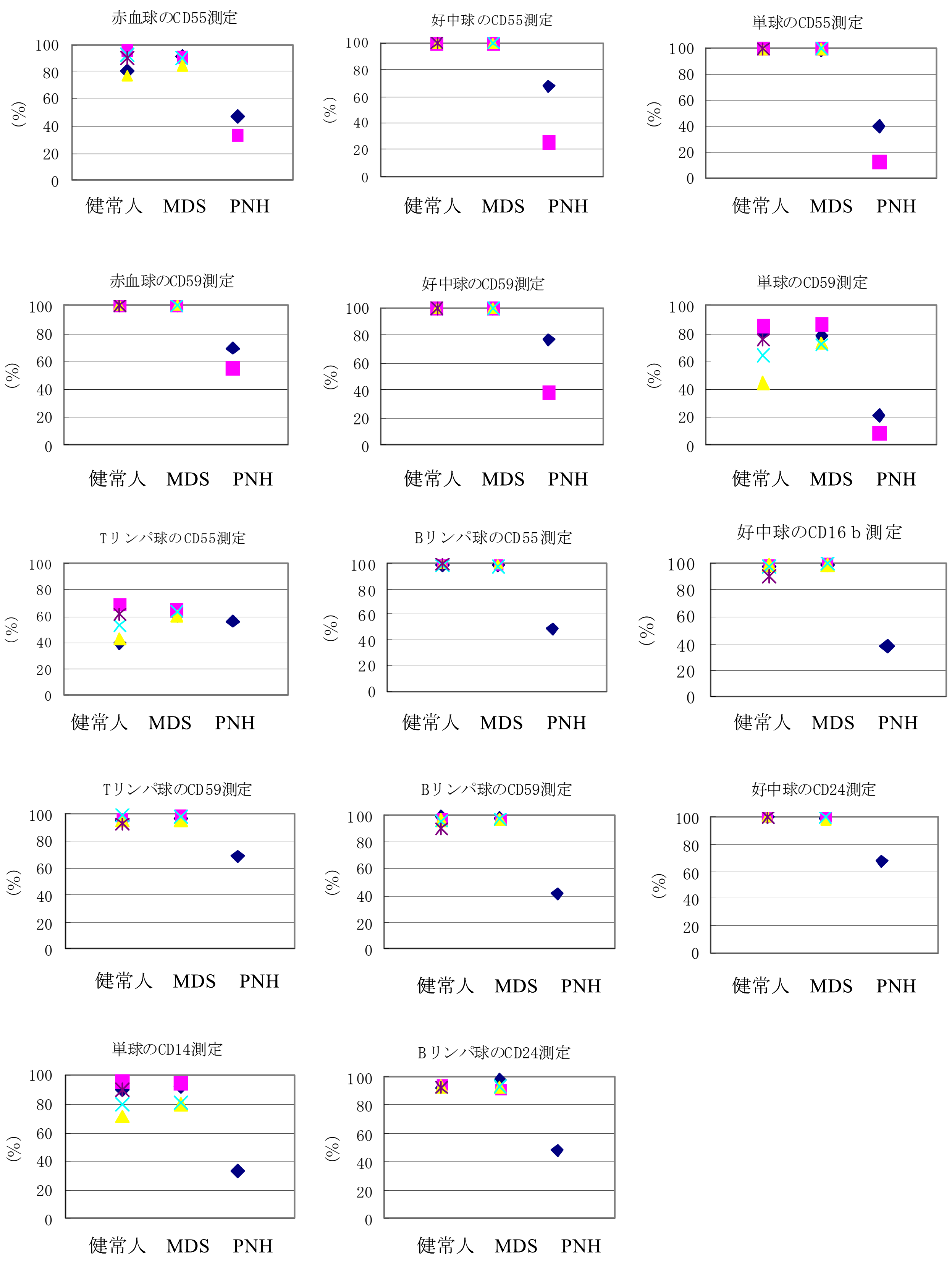


図2.　FCM による健常人、MDS、PNH におけるＧＰＩアンカー膜蛋白の発現量の比較

3.9 B リンパ球 (CD24) の測定

健常人 B リンパ球 CD24 の平均陽性率は、93.4±0.8%、発現蛍光量については蛍光強度の範囲が広いパターンを示した（図 1）。

MDS においては、健常人と同等であり平均陽性率は 93.8±3.0%であった(図 2)。

PNH においては、健常人と同様の発現量の血球から発現低下血球および完全欠損血球群に続くパターンを認め(図 1)、健常人や MDS と異なり多数の異常細胞を認めた(図 2)。

４．考察

FCM を用いて CD55 および CD59 の補体制御膜蛋白および GPI アンカー膜蛋白の CD16ｂや CD14、CD24 について分析し、末梢血による異常細胞の検出を試みた。

PNH において補体制御膜蛋白の測定は重要であり、CD55 は、補体活性経路の C3 および C5 変換酵素を阻害し、CD59 は C5b-9 複合体の形成および C9 重合化を阻害して補体防御作用を示している[1]。両者を測定することは臨床的意義が高いものであるが、今回の結果から、測定に使用する抗体によって信頼性（再現性・正確性）が異なる場合があり、注意すべきであると思われた。

赤血球では、健常人 CD55 は、蛍光強度が CD59 より低く陰性対照と一部重なる測定パターンのため、カットオフ値のとり方で陽性率が変動する可能性があった。一方、健常人 CD59 の発現蛍光量は強く、陽性率も高く安定しており異常細胞の検出に適していると思われた。

健常人好中球では、健常人 CD55 と CD59 ともに同等の蛍光強度であり陽性率も高く、CD16ｂが最も蛍光強度が高いものであったが、CD24 についても高値であり、いずれも陽性率が高く安定しており異常細胞の検出に適していた。

単球では、今回使用した CD59 抗体が MsIgG2a による抗体のためか、陰性対照の蛍光強度が強く、一部健常人単球 CD59 の蛍光と重なるパターンに測定され、陽性率が変動する要因になると考えられ、CD55 や CD14 の方が陰性対照より蛍光強度の分離が高く、正確な分析が可能と思われた。

T リンパ球では、健常人 CD55 のパターンは、陽性から陰性までの幅広い分布を示すことがわかった。また、カットオフ値のとり方で陽性率が変動する可能性が高く、解析には陰性対照が重要であると思われた。CD59 は平均発現率や蛍光強度も高く測定に適していた。

B リンパ球は、健常人 CD55 と CD59 はほぼ同等の蛍光量を示し、平均発現率も高値であり、検出に適していた。また、CD24 も同様に高発現率であったが、発現蛍光範囲が広いパターンを示し、弱い欠損細胞の検出には注意を要すると思われた。

MDS 症例における末梢血球の CD55 および CD59 の補体制御膜蛋白の発現量測定では、赤血球および白血球ともほぼ同等で低活性の細胞は認められなかった。また、CD16ｂや CD14、CD24 についても健常人の範囲内に計測された。

PNH 症例においては、赤血球および白血球とも健常人に比較し CD55 および CD59 の補体制御膜蛋白発現欠損の異常細胞を認めた。今回の症例では、赤血球および特に単球・B リンパ球での発現欠損細胞を多数認め、好中球では健常人と同様の発現量を持つ血球とともに、発現低下の異常血球や完全欠損細胞の３相性のパターンが観察され、FCM による方法は感度および特異性においても PNH の確定診断に有用と思われた。

５．結論

健常人と異なり PNH においては、赤血球・好中球・単球・リンパ球の補体制御膜蛋白（CD55,CD59）や CD16ｂ、CD14、CD24 の発現低下の異常細胞を FCM による測定で検出することができた。

補体制御膜蛋白 CD55 や CD59 の解析は重要であり異常細胞のクローン測定の意義も高いものであるが、測定に用いる抗体により再現性や正確性が異なる場合があり注意すべきである。好中球および B リンパ球では、どちらの抗体を用いても同等であるが、赤血球や T リンパ球では抗 CD59 抗体を、単球では抗 CD55 抗体を指標にした方が、より高い信頼性が得られると考えられた。

赤血球および白血球の GPI アンカー膜蛋白測定は、PNH の総合的な病態診断の 1 つの指標になると思われた。

参考文献

[1] 藤岡成徳. 発作性夜間ヘモグロビン尿症, 血液病学第２版, 三輪史朗編, 分光堂, 東京, (1995) 482-501.

[2] 堀川健太郎. 発作性夜間血色素尿症(PNH)における変異易発生の造血環境, Annual Review 血液, (2003) 50-57.

[3] 七島勉. 発作性夜間血色素尿症：その本質と臨床像の多様性, 臨床血液, 43 (2002) 68-75.

[4] 中尾眞二. 再生不良性貧血の病態と治療：免疫病態を診断するためのマーカー, 臨床血液, 44 (2003) 121-128.

計算物理学研究センターにおけるインターネット ライブ中継システムの構築と運用

○富田雅、神谷紀彦
筑波大学 研究協力部研究協力課（計算物理学研究センター）
〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1

１．はじめに

計算物理学研究センターでは，インターネットライブ中継システムを構築し，平成１４年１２月から運用している．このシステムは，目的の第一として，センターで開催されるセミナーやシンポジウムをインターネットを介して世界中に配信すること，第二として，研究者がその場にいながら国際会議を行える仕組みを，構築・運用することを目指した．ここでは，構築したシステムの詳細を述べ，現在までの運用実績を紹介する．

２．システムについて

システムを構築する上でセミナーやシンポジウムなどの用途にはインターネット上で単一方向の１対多のブロードキャスト配信を，国際会議などの用途では多対多の双方向通信を行う必要がある．このシステムは以下の技術や製品を用いて構築した．

2.1 全体構成

システムは，図１に示すように，講演を配信するだけのセミナー形式と，双方向の会話を行うディスカッション形式の二つの形態で使い分ける．

セミナー形式ではRealNetworks®のRealSystem®を使いライブ配信を行う．天井に設置した可動型のカメラで映像を撮影し，音声はワイヤレスマイクにより採取する．これらをビデオキャプチャカードを通じて encoder 用 PC に入力し，Helix Producer9.0 ソフトウェアにて RealMedia™形式に encode する．このデータをネットワーク経由で本センター計算機室に設置した Helix Universal Server に送信し Broadcast 配信を行う．ユーザは RealPlayer にてリアルタイムでプレゼンテーションを見ることが可能である．

ディスカッション形式では Polycom®Viewstation™ FX BRI(以下 Viewstation)で会議を行う．Viewstation で会議を行う場合は複数名の参加者がカメラに映る席に座り，IP あるいは ISDN を介して遠隔地と接続する．相手の映像は Viewstation と接続した液晶プロジェクタよりスクリーンに投影される．音声は Viewstation 内蔵のスピーカまたは液晶プロジェクタのスピーカを利用する．

ただし，Viewstation 単体では接続拠点数に制限があり，相手が Access Grid や MBONE で接続してくる場合にはカリフォルニア工科大学を中心に開発運用されている会議システムである VRVS を用いる．この場合，音声と映像の送信については高画質である Viewstation を利用し，受信については MBONE で接続した PC より映像を液晶プロジェクタに送る．

2.2 RealSystem

RealSystem®はインターネットを使用して音声・映像を配信するシステムである．配信に必要なのは，encoder と呼ばれる映像と音声をマージして

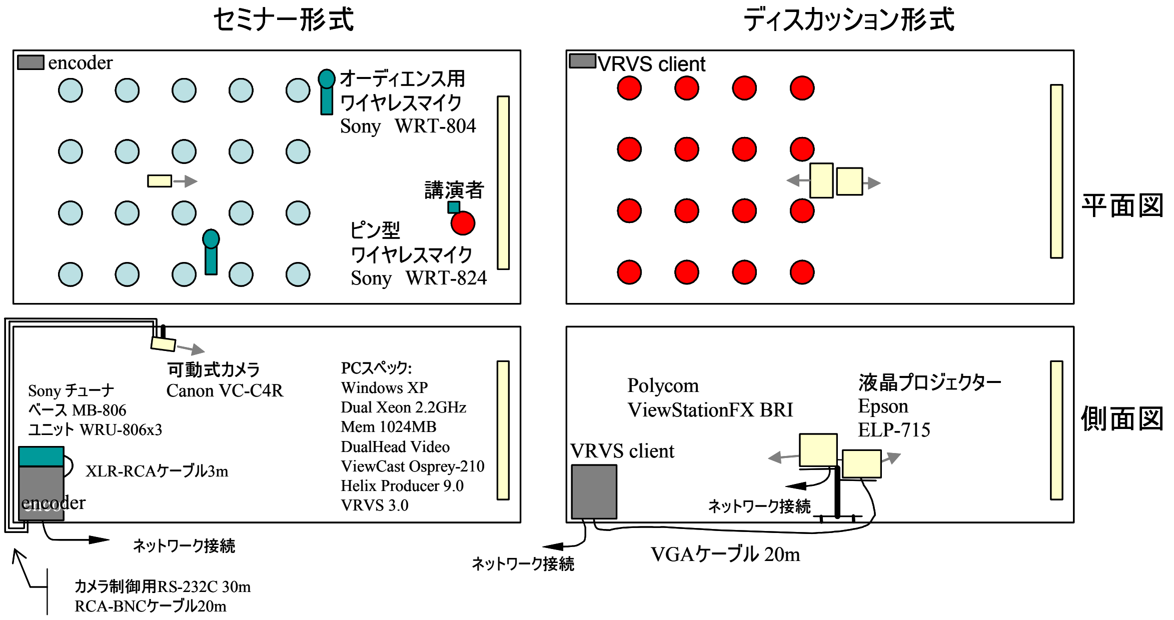


図 1 システム構成図

RealMedia™形式に変換するマシンと，Helix Server と呼ばれる配信を行うマシンである．encoder には映像を入力する為のビデオキャプチャカードにカメラが接続されており，音声入力としてマイクが必要である．カメラは USB 接続のカメラでも代用が可能である．

PC に入力された映像と音声は Helix Producer 9.0 でインターネットに配信できる形に encode し，同時にネットワーク経由で配信用の Helix server にデータを送信する．この配信と同時に Helix server では NFS ファイル共有している File server へも配信データの録画ファイルを作成する．
インターネット越しにこの配信を見る為には RealPlayer®が必要である．

2.3 Viewstation

Viewstation は IP 接続及び ISDN 接続の両方に対応したシステムで，IP 接続の場合 H.323，ISDN の場合は H.320 と呼ばれるプロトコルに準拠している．H.323 に準拠したものとしては他に Windows 上の NetMeeting がこれに該当するので相互に接続が可能である．また，Viewstation はマルチポイント（多地点会議機能）の中継機能を持っており，IP の場合でも ISDN の場合でも，当該サイトを含め最大４拠点の画像と音声をマージして他の全拠点に放送でき，４拠点を 384Kbps で接続することができる．（３拠点の場合は 512Kbps）．ただし，IP 接続と ISDN 接続を混在させたマルチポイント会議は行えない．

また，最近では H.323 より新しい SIP(Session Initiation Protocol)が IETF により標準化され，Windows XP の Windows Messenger ではこのプロトコルを採用している．

2.4 VRVS

VRVS(The Virtual Room Videoconferencing System http://www.vrvs.org/)はカリフォルニア工科大学を中心に 1995 年から開発がはじめられ，1997 年から本格的に運用が開始された，高エネルギー物理学のコミュニティで発展してきたビデオカンファレンスシステムである．VRVS は WEB ベースのインターフェイスを持ち，様々なタイプのビデオカンファレンスシステム（H.323,SIP,MBONE,QuickTime）を中継するビデオ会議システムで Windows,Linux,MacOS X,Unix など多くのプラットホームに対応している．VRVS を利用するには，最初にアカウントを取得し，使用する PC に VRVS ソフトウェアパッケージ（VRVS 3.0）をインストールすれば誰でも利用することが可能である．現在では７千人の利用者がいる．

いずれのシステムでも，学内ネットワークの firewall の特定のポートをオープンする必要がある為，筑波大学の学内ネットワーク運用ポリシーに従いポートのオープン申請が必要である．

３．システム運用

3.1 RealSystem

RealSystem®の運用は特に難しい点はないが，インターネットの先にいる各々のユーザが，自分のネットワーク環境に適した最適な通信速度で接続できるように支援するため，encode の際に SureStream™ を作成するよう適宜設定を行うのが望ましい．また，encoder が NAT の内側から配信を行う際は，Helix Producer の Server Destination を開き Advanced Option 内の Listen Address に，FW 外側の NAT 変換と対になる Global IP Address を指定する必要がある．

3.2 Viewstation (H.323 または H.320)

Viewstation 単体で使用する場合は比較的少人数の会議に適しており H.323 または H.320 で通信を行う相手も同じプロトコルである必要がある．(MPPlus の場合は別のプロトコル同士の通話が可能)最低限 Viewstation とテレビがあれば会議を行うことが可能である．会議には相手の電話番号もしくは IP address が分かれば通話を開始することができる．相手の映像はテレビモニターに出力される．もし，マルチポイント会議の場合は複数のサイトの映像が表示されることになるが，画像は Voice Switch 機能で音声発信中のサイトへ自動的に切り替わる．

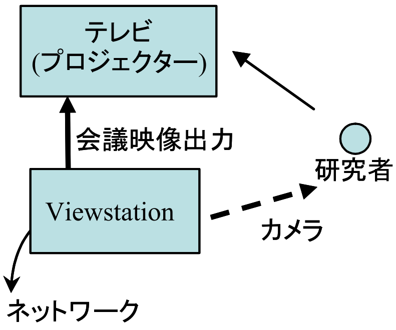


図 2　Viewstation

3.3 VRVS+MBONE

VRVS で MBONE ソフトウェアパッケージを利用した場合の特徴は，接続拠点に制限がないことが挙げられる．会議に必要な機材は PC 1 台と PC に接続できるカメラである．PC には予め VRVS 接続用のソフトウェアパッケージがインストールされている必

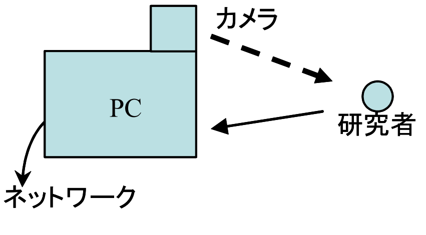


図 3　VRVS+MBONE

要があり，これには MBONE ソフトウェアも含まれている．接続の方法としては PC から WEB ブラウザで VRVS に接続し任意の Virtual Room(Meeting room)を指定する．映像と音声の入出力の設定では VRVS

にて VIC(video application) と RAT(audio application) を選択し，CONNECT で接続が開始される．しばらくして video と audio のコントロールパネルが起動されるので適宜マイクやカメラを ON し，他サイトの画像が全てプレビューウィンドウに表示されるので，そこから任意の画像をオープンする．まれに，RAT4 が使えない場合があるのでその際は RAT3 を使用する．

また，Viewstation 単体の会議とこれを比較すると，PC に接続するカメラは比較的性能が悪い為，解像度が低い事が欠点と言える．

3.4　VRVS+Viewstation (H.323)

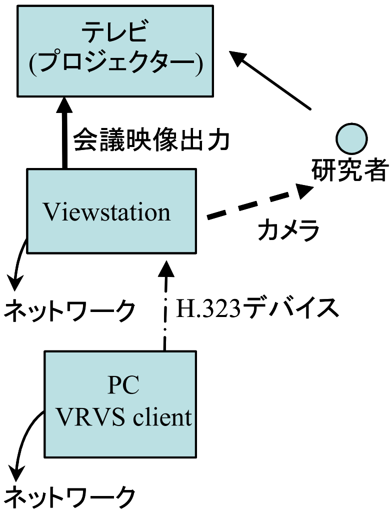


図 4　VRVS+Viewstation(H.323)

VRVS と Viewstation を組み合わせて使用する場合の特徴は，接続拠点に制限がなく，入力デバイスとして Viewstation を使用する為，高解像度である．接続の方法としては，3.3 節と同様に PC から WEB ブラウザで VRVS に接続し任意の Meeting room を指定する．さらに，client type として H.323 を指定し，これに対して Viewstation の IP アドレスを指定する．CONNECT で接続が開始され，こちらの音声と映像は Viewstation を通して VRVS に送信される．相手の映像は Viewstation からモニタに出力される．マルチポイント会議の場合の映像の切り替え方法は VRVS では４つの動作を選択できるが，3.2 節で述べた方法と同じ Voice Switch 機能が最適である．

表 1　VRVS 接続可否

		会議相手		
		H.323	MBONE	AG
接続方法	H.323	○	映像受信のみ NG	映像受信のみ NG
	MBONE	○	○	○
	AG	○	○	○

欠点としてこの方法で接続した場合は表 1 の通り相手が全て H.323 でないとうまく接続ができないことがあげられる．

3.5　Access Grid via VRVS (+ Viewstation)

Access Grid(以下 AG)とは，1999 年より米 Argonne 国立研究所 Futures Laboratory の The Access Grid Project(http://www.accessgrid.org/)によって開発された，グリッド技術を用いたビデオ会議システムで，これを使うには専用のハードウェア・ソフトウェア・ツール・ネットワークが必要であり，現在では世界で１５０以上の機関で利用されている．

VRVS では AG との中継機能があり，VRVS から AG の Virtual Venue(meeting room)へ参加することもその逆も可能である．

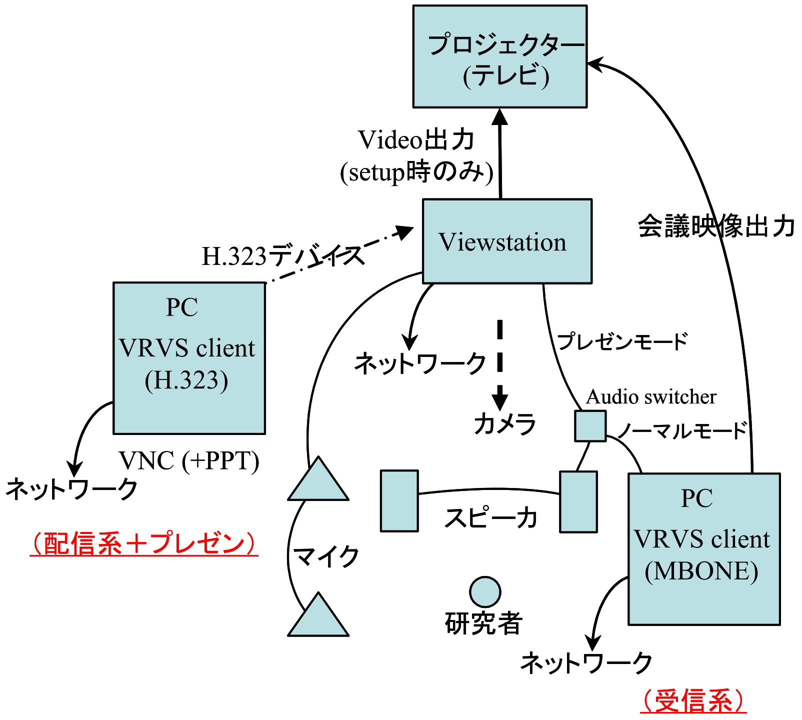


図 5　Access Grid via VRVS(+ Viewstation)

VRVS を使い AG 側と会議を行う為には，表１のように MBONE を使用する必要がある．ただし，上述のように MBONE で利用するカメラでは解像度が低い為に以下のような構成で接続を行う．必要な機材は PC 2 台と Viewstation を使い，配信には Viewstation を利用し（配信系），受信には MBONE を利用する（受信系）. 配信系では，VRVS の Meeting room で AG を選択し，ビデオ会議クライアントとして H.323 機器である Viewstation を指定すると，こちらの映像と音声が配信できる．受信系でも同様に，VRVS の Meeting room で AG を選択し，ビデオ会議クライアントとして MBONE を指定し映像と音声の受信を行う．ただし，会議の際プレゼンターがこちら側にいる場合は，オーディオスイッチャーでスピーカを配信系である Viewstation のオーディオ出力に切り替える．（表１の通り，音声のみの受信については，配信系である H.323 で受けることが可能である）この時，音声入力が Viewstation で音声出力が MBONE の場合にはエコーバックが発生してしまうが，これを防ぐ為に Viewstation で音声の入力と出力を行うことでエコーキャンセラー機能を使うことにより解決できる．ただし，Viewstation と MBONE の音声出力を比較すると，クオリティが高いのは MBONE の為，上記のように適宜切り替えて利用する.

さらに，配信系ではもう一つ別の機能として，プレゼンテーション中の PowerPoint を VNC サーバで公開する．これは，会議に参加している人がリモートから直接ネットワークを介してこの PC にアクセスし，プレゼンテーションを見ることが可能である.

４．運用実績

計算物理学研究センターでは，本システムを平成 14 年 12 月から運用している. 運用実績は以下のとおりである：

セミナー形式

・Asia-Pacific Mini-Workshop on Lattice QCD（平成 15 年 1 月 23 日，24 日）

・計算物理学研究センター計算科学コロキウム（隔月）

・外国人研究員等によるセミナー，連続講演等（不定期）

ディスカッション形式

・International Lattice Data Grid (ILDG) Workshop (http://www.lqcd.org/ildg/)第一回（平成 14 年 12 月 19 日），第二回（平成 15 年 5 月 2 日），第三回（平成 15 年 12 月 5 日）

・Viewstation 単体によるテレビ会議（週１回程度，日常的に使用）

特に第三回 ILDG Workshop（平成 15 年 12 月 5 日）では，EPCC（Edinburgh，英国），FNAL（シカゴ近郊，米国），JLAB（バージニア，米国），Boston 大学（ボストン，米国），Utah 大学（ソルトレーク，米国），Zeuthen（ベルリン，ドイツ），本センター（つくば，日本）の世界７地点を結んだ国際ワークショップが実現したことは顕著な実績である．その風景を図６に示す.

５．まとめ

このシステムを構築したことにより，従来 text ベースや音声ベースでしかコミュニケーションをとれなかった遠隔地の研究者と，直接部屋の中で会話を行っているような自然なディスカッションが可能となり，以前と比べより研究者間で密接なコミュニケーションを図ることが可能となった．また，センターで開催されるセミナーやコロキウムをセンターに来なくても見ることができ，アーカイブされた録画を見ることによりいつでも必要な時に閲覧が可能となった.

今後の課題は以下のことが挙げられる. RealSystem で Broadcast 配信を行う際に配信データの録画ファイルを保存するが，正常に書き出されないケースがある．具体的には一時ファイルの状態のままとなってしまうので，正しく書き出されるようにする.

RealSystem でオーディエンスの声の入力をハンドマイクを使用しているが，ハンドマイクを意識しないで普通に会話をして音がひろえるようにしたい.

ディスカッション形式で利用する場合，今まではカメラが１台で全体を映していたが，今後は全体と講演者だけの２台で運用できないか検討中である.（旧式の H.320 ビデオ会議システムの video 出力で MBONE カメラとして利用できないか検討中である.）

図 6　世界７ヶ所を結んだ第三回 ILDG Workshop の風景（平成１５年１２月５日）

Unix/Windows 一石二鳥プログラミング

木村博美[1]
筑波大学　人文・数理等教育研究支援室（加速器センター）
〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

Unix/Windows 混在環境では、両方の環境で動作するようなプログラムを作成することが望まれます。幸い、最近ではそのような要求に応えるツールが簡単に入手できます。この報告ではそのようなツールを使った実例をいくつか紹介します。

１．はじめに

ここで言う一石二鳥とは、一つのプログラムがそのままあるいは再コンパイルするだけで Unix と Windows 上で同じ様に使用できることを指します。その為には、両環境の違いを吸収する何らかの仕掛けが必要ですが、幸い、現在ではインターネットからそのようなツールを容易に入手できます。本稿では、スクリプト言語、Java 言語、ライブラリの使用という３つの方法を紹介します。

２．スクリプト言語の使用

Perl に代表されるスクリプト言語の多くは Unix/Windows 両環境で動作します。一石二鳥プログラミングにおいてスクリプト言語を使用する最大の利点は、開発サイクルの短縮でしょう。つまり、プログラムの作成・修正とテストの繰り返しを短時間で実行することができます。また Windows の開発環境が不要である点も有利でしょう。更に、スクリプト言語の多くは追加モジュールで機能を追加することができます。しかし環境依存になってしまう恐れがあるので、注意が必要です。

欠点は、処理速度の遅さとメモリ消費量の多さでしょう。

2.1 スクリプト言語の紹介

Perl は最も良く使われている言語でしょう。追加モジュールも豊富で、万能と言っても良いでしょう。書籍やインターネットで得られる情報も豊富です。処理速度もスクリプト言語の中では速い方です。ただ、プログラムは読みにくくなりがちです。

Perl は後付けでオブジェクト指向の機能を追加しましたが、Ruby や Python は最初からオブジェクト指向の言語として設計されました。そのため、Perl に比べるとずっと読みやすいプログラムを書くことができます。ただ、Perl に比べると処理速度は遅いようです。

Tcl/Tk はスクリプト言語の中で唯一標準で GUI をサポートする言語です。ただ、言語仕様が貧弱なため、他の言語と組み合わせて使用されることが多いようです。

2.2 実例

当センターでは実験装置から計算機へのデータ転送／形式変換プログラムを Perl で作成しました。この実験装置はデータの取り出し口が RS-232-C しか無いため、ターミナルサーバを利用して、ネットワーク経由でデータを取り出せるようにしてあります（図１）。PC 上のプログラムは TCP/IP でターミナルサーバと通信し、取り出したデータをユーザの指定した形式に変換してファイルに書き出すという単純な仕様です。そのため GUI は必要ありませんでした。

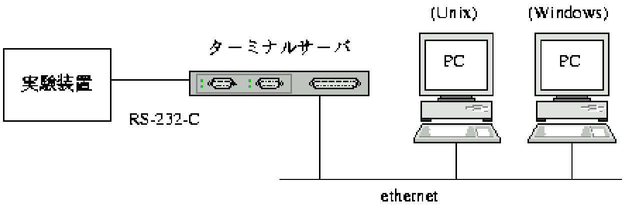


図１．実験装置の接続

```
$vs = "";
vec($vs,fileno(SOCKET1),1) = 1;
vec($vs,fileno(SOCKET2),1) = 1;
$in1 = $in2 = 0;
$timeout = 2;
$minsize = 200;
while(1){
    $nin = select($vsout=$vs,undef,undef,$timeout);
    if($nin < 0){ die "select: $!"; }
    if($nin > 0){
        if(vec($vsout,fileno(SOCKET1),1)){
            sysread(SOCKET1,$rbuf,$rsize)|| die "read: $!";
            $n = length($rbuf);
            @buf1[$in1 .. $in1+$n-1] = unpack "C$n",$rbuf;
            $in1 += $n;
        }elsif(vec($vsout,fileno(SOCKET2),1)){
            sysread(SOCKET2,$rbuf,$rsize)|| die "read: $!";
            $n = length($rbuf);
            @buf2[$in2 .. $in2+$n-1] = unpack "C$n",$rbuf;
            $in2 += $n;
        }
    }else{                          # timeout
        last if ($in1 > $minsize || $in2 > $minsize);
    }
}
```

図２．スクリプト（一部）

[1] http://www.tac.tsukuba.ac.jp/~hiromi/

実際のスクリプトの一部を図２に示します。装置を２台まで使用できるようにするためにselectで入力を待ち、読み込んだデータをそれぞれのバッファに蓄えます。入力終了はselectのタイムアウトで判断し、その後でバッファを解析し、データを変換します。

このプログラムは、かつてミニコンを使っていた頃は FORTRAN で書き（装置はミニコン本体に接続）、Unix に切替えた時は C で書きましたが、Windows にも対応する必要から Perl で再度書き直しました。なお、Windows 版 Perl には ActivePerl を使用しました。

３．JAVA 言語の使用

Java の大きな特徴はGUIも標準ライブラリに含まれている点です。ただし、古いバージョンの AWT と新しい Swing の２つあるので、移植性を考えるとAWTを使用することになります。最近では統合開発環境 Eclipse の SWT(Standard Widget Toolkit)を使うという方法もあります。

一石二鳥プログラミングでの利点は、Java は中間コード方式なので、コンパイルして作成したjarファイルをプラットホームに関係無く使用できるという点です。

3.1 実例

当センターではデータ表示解析プログラムの１つを Java で書きました（図３）。元々は FORTRAN で書かれたプログラムですが、GUI ライブラリが可搬性のないものだったので、Windows への対応のために Java で書き直しました。このプログラムはデータファイルを読み書きするので、ブラウザに表示する Java applet ではなく、単独アプリケーションとして作成しました。GUIはAWTを使用しました。

このプログラムは実験データのファイルを読み込み、画面に表示した後、マウス操作でデータの切り出しとファイルへの書き込みを行います。

Java のおかげで Unix/Windows だけでなく MacOS でも使用できました。更にグラフィクスの印刷機能も 簡単に追加できました。ただし、メモリと CPU を要求するのが欠点です。

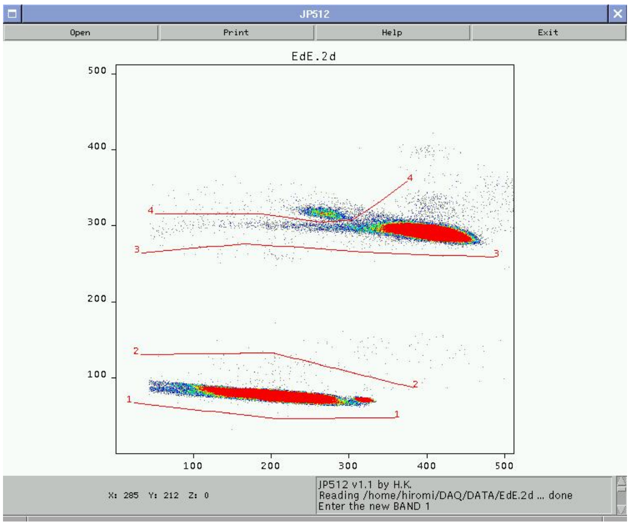


図３．Java で書いたプログラムの動作画面

開発は Unix に複数の JDK（1.1.8、1.2.2、1.3.1）を入れ、それぞれで動作を確認してから Windows で最終的な動作確認をしました。

４．ライブラリの使用

一石二鳥プログラミングに使用可能なライブラリもいくつか存在しますが、プラットホーム毎にライブラリを用意し、個別にコンパイルしなければならないのが欠点です。しかし、出来上がったアプリケーションは最も効率良く動作します。

4.1 ライブラリの紹介

GTK+ は画像処理プログラム GIMP を開発する過程で作成された C 言語用の GUI ライブラリです。Unix ではデスクトップ環境の GNOME をはじめ広く使われており、Windows にも移植されています。GUI 画面の設計は Unix 上で Glade を使用します。

C++用では Qt が最も優れています。デスクトップ環境の KDE に使用されている他、ボーランド社の製品である Delphi/Kylix のライブラリとしても採用されています。Unix 版はフリーですが、Windows 版は教育用のみフリーで使用できます。GUI 画面の設計は Qt Designer で行います。

Unix/Windows 共通の統合開発環境が必要なら WideStudio という選択もあります。Windows 版には GCC も含まれていますので、インストールの手間も掛かりません。

4.2 実例

当センターではネットワーク接続された装置の制御・データ読み出しプログラムに GTK+を使用しています（図４）。ただし、GTK+ にはネットワークライブラリは含まれていないので、Unix の socket と Windows の winsock を呼び出すラッパーを作る必要がありました（図５）。

このプログラムは画面の左半分にデータを、右半分に装置の設定を常時表示することで、ユーザの利便性を高めています。また、ネットワークライブラリを使ってプロセス間通信を行い、複数のプログラムの協調動作を実現しています。

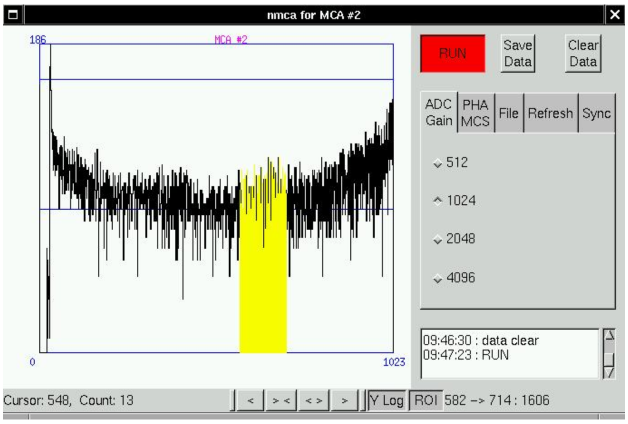


図４．GTK+を使用したプログラムの動作画面

使用言語は C で、Unix では GCC、Windows では Visual C++でコンパイルしました。画面設計は Galde を使用しました（図６）。

```
int
Net_udp_client (char *server, int port,
                struct sockaddr_in*serv_addr)
{
   struct sockaddr_in cli_addr;
   struct hostent *hp;
   int sock;

#ifdef WIN32
   WORD vreq;
   WSADATA wsadata;
   /* init winsock */
   if(!init){
      vreq = MAKEWORD(1,1);
      if(WSAStartup(vreq,&wsadata) != 0){
         return NG;
      }
      atexit((void(*)(void))(WSACleanup));
      init = 1;
   }
#endif

   hp = gethostbyname(server);
   if(hp == NULL) return NG;
   memset((char *)serv_addr, 0, sizeof(struct sockaddr_in));
   serv_addr->sin_family = AF_INET;
   memcpy((char *)&(serv_addr->sin_addr),
            hp->h_addr,hp->h_length);
   serv_addr->sin_port = htons(port);

   if((sock = socket(AF_INET, SOCK_DGRAM, 0)) < 0){
      return NG;
   }
```

図５．ネットワークライブラリ（一部）

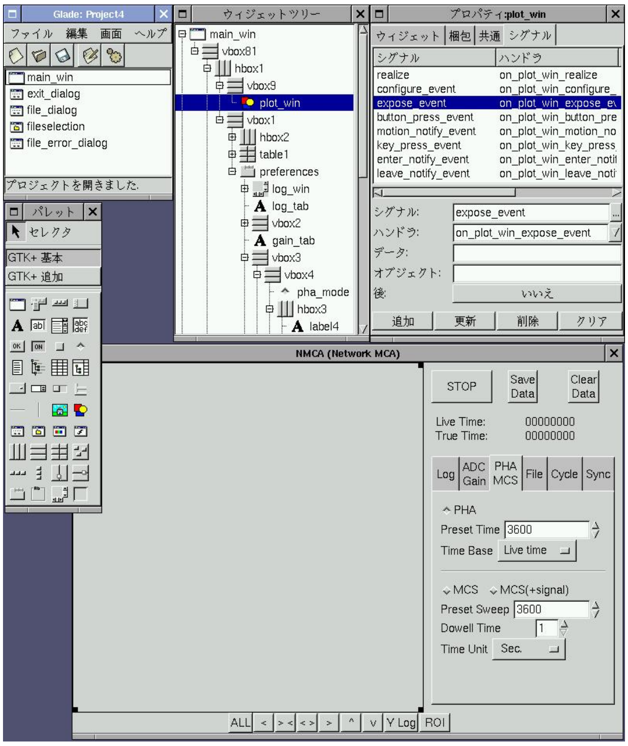


図６．Glade による画面設計

参考文献

[1] Perl
URL: http://www.perl.com/
URL: http://www.perl.org/
[2] Ruby
URL: http://www.ruby-lang.org/ja/
[3] Python
URL: http://www.python.org/
[4] ActivePerl
URL: http://www.activestate.com/Products/ActivePerl/
[5] Tcl/Tk
URL: http://tcl.sourceforge.net/
[6] Eclipse
URL: http://www.eclipse.org/
[7] The GUI Toolkit, Framework Page
URL:http://www.geocities.com/SiliconValley/Vista/7184/guitool.html
[8] GTK+
URL: http://www.gtk.org
[9] GIMP
URL: http://www.gimp.org/
[10] GTK+ for Win32
URL: http://www.gimp.org/~tml/gimp/win32/
[11] GNOME
URL: http://www.gnome.org/
[12] Qt
URL: http://www.trolltech.com/products/qt/index.html
[13] KDE
URL: http://www.kde.org/
[14] Delphi/Kylix
URL:http://www.borland.co.jp/
[15] WideStudio
URL: http://www.widestudio.org/
[16] Glade
URL: http://glade.gnome.org

論文の PDF 化テクニック ～冊子印刷、web 掲載を前提に～

大和良広
筑波大学 人文・数理等教育研究支援室（加速器センター）
〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

加速器センター利用者論文集[1]や UTTAC Annual Report[2] 、第２回技術職員技術発表会予稿集[3]などの原稿の PDF 化とその web 掲載及び PDF,Post Script データ提供によるデジタル印刷依頼などの業務で得られたきれいで再現性の高い PDF file にするための様々なノウハウを日本語論文に的を絞って報告する。英語論文についてのノウハウは、高エネルギー加速器研究機構(以下 KEK)で不定期に行われている『電子出版講習会』で非常に詳しく教わることができる。筆者もこの講習会に参加したのでその報告も行う。

１．はじめに

PDF (=Portable Document Format)とは、米国 Adobe Systems 社が開発した電子文書配布用のデータ形式(電子の紙)のことで、Adobe Acrobat , Illustrator などで作成でき広くインターネット上でも利用されている。「PDF にすればどんな環境でも同じように見られて、同じように印刷できる。」という認識が浸透している様だが、実は、どんなプラットフォームでも原稿作者の意図する表示状態及び印刷状態を保った PDF file を作るのはあまり簡単な作業ではない。Windows で見ても、Mac で見ても、UNIX で見ても同じ状態でどのプリンターで印刷してもほぼ同じになる PDF file の作り方の一例を報告する。

また、最近リリースされた、OpenOffice 1.1 では Adobe Acrobat を使用しないでも比較的きれいな PDF file を簡単に出力することができるのでその評価、使用感も報告する。

２．Adobe Acrobat で PDF にする

2.1 Acrobat のアップデート

Adobe Acrobat は ＣＤ からインストールしただけの状態では不具合があるので修正プログラム[4]をインストールする必要がある。Acrobat 5.x の場合は日付の古い順に全てインストールする。 Acrobat 6.0 の場合は [ヘルプ] – [更新]でアップデート可能である。

2004 年 1 月現在、Acrobat 5.0.7 , 6.0.1 が最新版である。

2.2 原稿作成時の使用フォントの制限

日本語フォントは、MS 明朝（又は、細明朝、平成明朝）、MS ゴシック（又は、中ゴシック、平成角ゴシック）。英字フォントは、Arial, Times (Times New Roman), Helvetica,Symbol のみを使用するのが望ましい。印刷時の業者側の問題と全体の統一感の点が理由である。Microsoft Word での編集時はもちろん、Excel 、その他グラフソフトでの横軸縦軸、データラベル、吹き出しなど、Adobe Illustrator や Canvas などのドロー系ソフト内、各種 CAD ソフトなど論文内に貼り付けるすべてのアプリケーションソフトですべてのフォントを変更する必要がある。しばしば利用される Excel はディフォルトで **MS P ゴシック**になっているので注意が必要である。

また、日本語のボールド、イタリック、ボールドイタリックは、Post Script 標準にないので、ボールド MS 明朝 → MS ゴシック 等に置換する必要がある。

ただし、後述するフォントの埋め込みが行えるフォントであればフォントを埋め込むことでこれらの制限を回避できる。

2.3 フォントの埋め込み

日本語フォントでは、Windows の場合、MS 明朝・MS ゴシック、Mac の場合、細明朝・平成明朝・中ゴシック・平成角ゴシックのみの使用でほぼ問題ないフォント埋め込み無しの PDF file が出来るが、原稿作者が画面で見たままの状態で他者に配布したり他所で印刷したりするためにはフォントの埋め込みが必要である。特に、第二水準漢字コードまで以外の外字や機種依存文字（ローマ数字Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳや丸付き数字①②③、単位記号などの特殊記号等）などを別の環境で文字化けしないで見るためには不可欠である。もっとも、web に掲載する事を考えると機種依存文字は使わない方が良い。

2.4 での PDF file 作成の設定例では全てのフォントを埋め込むようにしてある。

2.4 Adobe PDF / Acrobat Distiller での PDF 化

一般的なデジタル印刷対応の印刷業者の注意事項にも書かれているが、PDF Writer は使わず、Adobe PDF 又は Distiller を使用する。PDF Writer ではフォントの埋め込みが出来ず、印刷時のカラーが正確に表現できないからである。Acrobat 6.x の場合、最初から PDF Writer がないので気にする必要がない。

Acrobat をインストールすると Word などに追加される PDF Maker は簡単に PDF 化できて便利なのだが、筆者の環境では、Acrobat 5.0.7 では非常に快

---

1 http://www.tac.tsukuba.ac.jp/uttac/thesis.html
2 http://www.tac.tsukuba.ac.jp/uttac/annual/
3 http://www.tac.tsukuba.ac.jp/tech2002/abstract/
4 http://www.adobe.co.jp/support/downloads/main.html

適に動いた Word の PDF Maker が Acrobat 6.0.1 では時間がかかりすぎて実用的でなかったことを申し添える。

冊子印刷や web 掲載を念頭に作成する場合には、Adobe PDF/Distiller の細かい設定が必要である。以下にその設定の一例を示す。環境は、Windows XP / Office XP (Word 2002) / Adobe Acrobat 6.0.1 を用いた。

A. Adobe PDF プリンタを通常使うプリンタに設定
B. Adobe PDF プリンタドライバの設定[Adobe PDF 設定]－[フォントを送信しない] オフ（図１～３）
C. Press Quality をひな形に冊子印刷用の設定ファイルを作成する。 [PDF 設定] を [Press Quality] に変更後 [編集] を選択（図３）
D. [互換性のある形式] を PDF 1.3 に設定する。ただし、すでに UNIX 用の Adobe Reader も Version 5.x が存在するので後述するセキュリティー等の安全面から考慮すると PDF 1.4 に設定しても良い。（図４）
E. [解像度] を 1200 dpi とする。これは印刷業者のハードウェア水準によるが経験上 1200 dpi 程度で十分である。
F. [ディフォルトページサイズ] を A4 の寸法に変更する。なぜか最初に入っているサイズは A4 サイズではないので注意が必要。
G. 設定後、[名前を付けて保存] で自分の PDF 作成設定ファイルとして保存する。この例の場合、「yamato Press Quality」

図１

図２

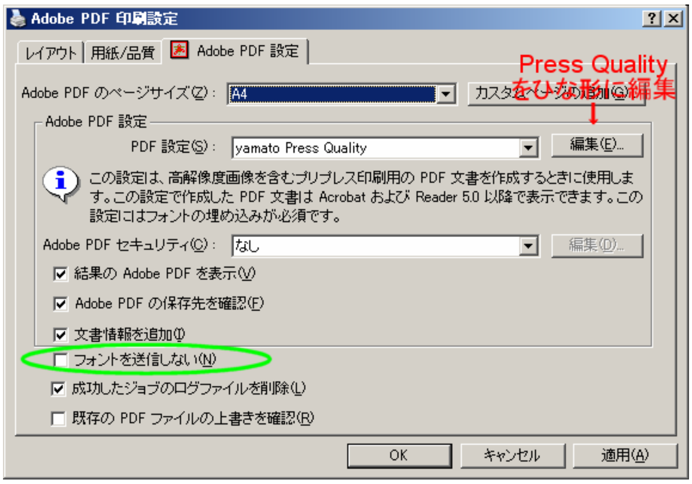


図３

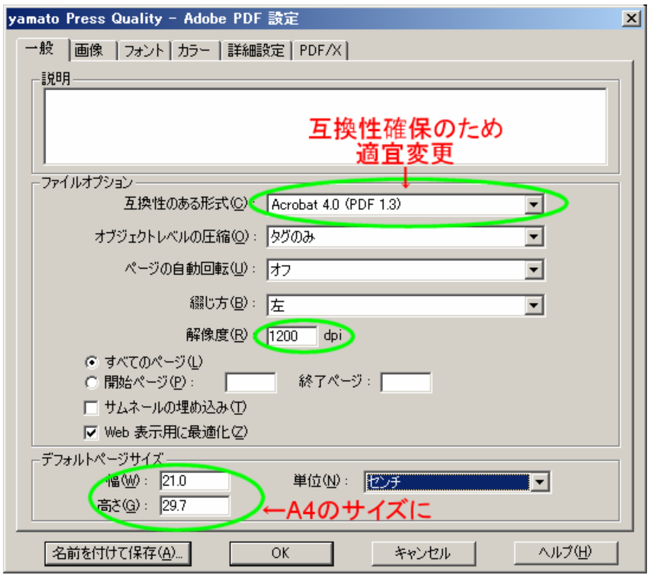


図４

H.　Adobe PDF 印刷設定に戻り、[レイアウト] - [詳細設定]（図５）

I.　[印刷品質]　1200dpi
　　[TrueType フォント]
　　　　ソフトフォントとしてダウンロード
　　[PostScript 出力オプション]
　　　　エラーが軽減するよう最適化
　　[TrueType フォントダウンロードオプション]
　　　　Native TrueType
　　と設定する。（図６）

J.　Adobe PDF のプロパティーに戻り、[デバイスの設定] で [フォントサイズ] を 1 ピクセルにし、小さなフォントもアウトラインできれいに保存するようにする。（図７）

K.　Word で PDF 化したいファイルを開く。

L.　Word のプリントオプション設定（図８）

M.　印刷ボタンを押して PDF file を作成（図９）

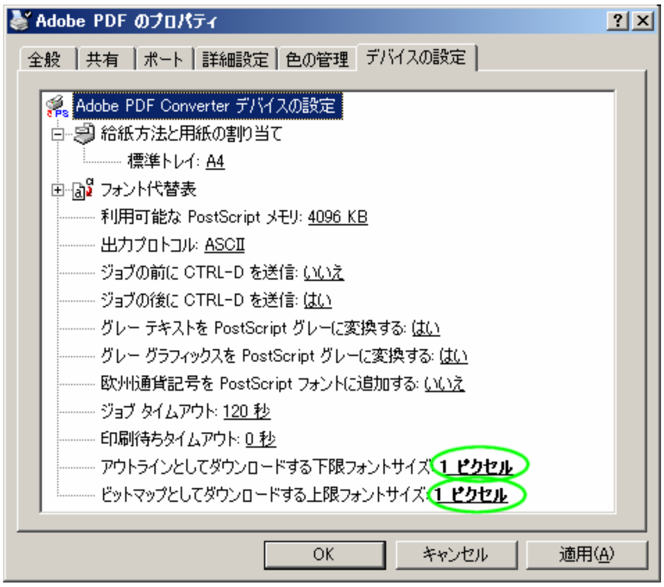


図７

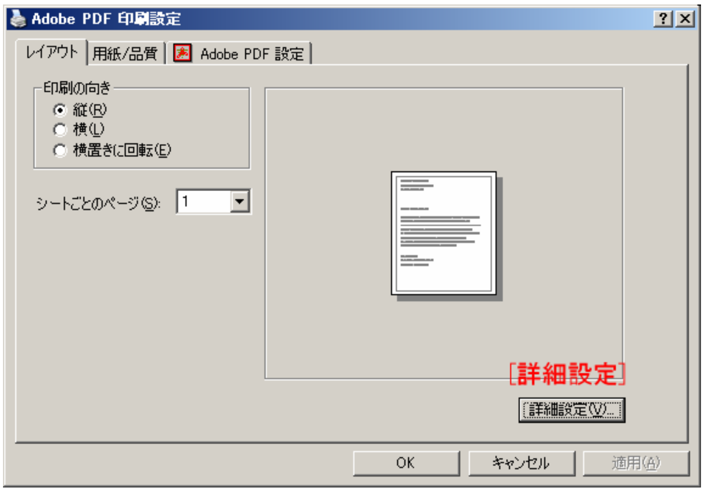


図５

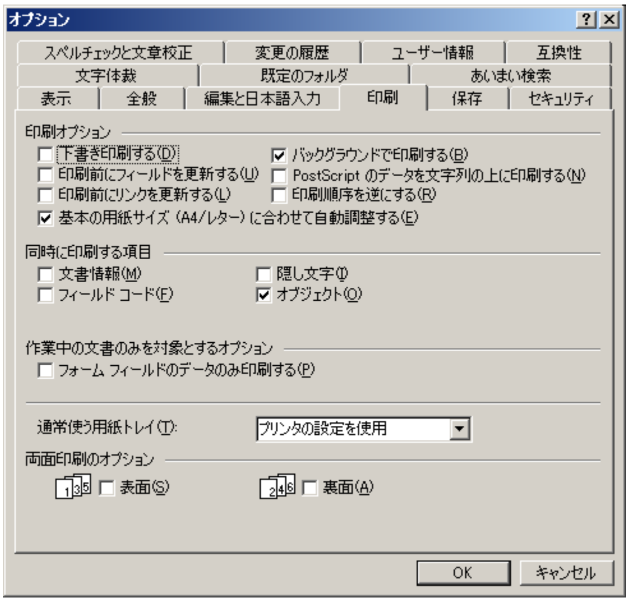


図８

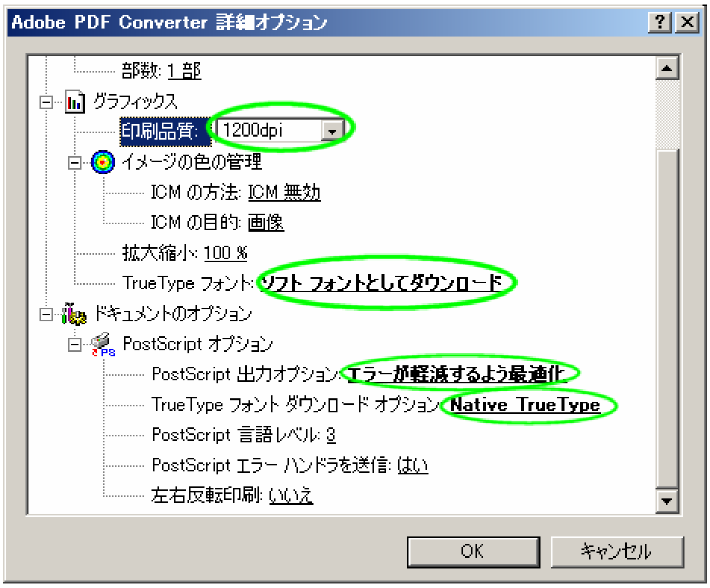


図６

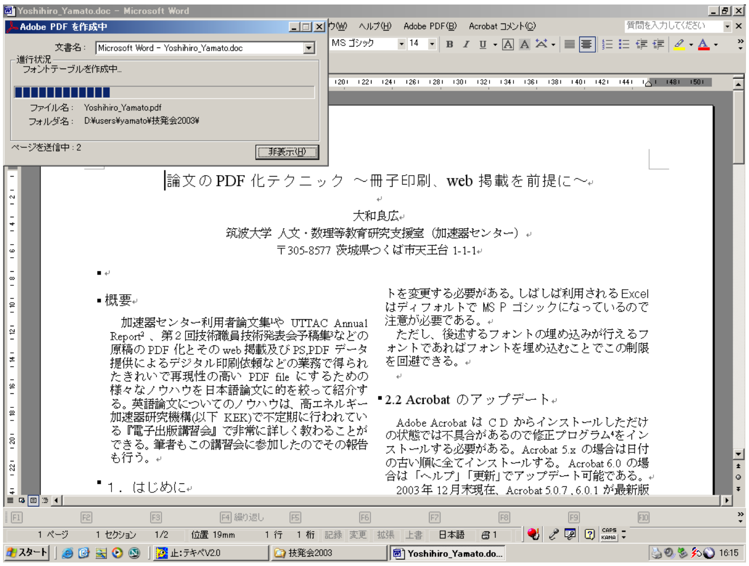


図９

2.5 フォントのチェック

出来上がった PDF file にきちんとフォントが埋め込まれているか、また、意図しないフォントが使用されていないか確認する。

[ファイル] - [文書のプロパティー] – [フォント] タブで全てのフォントが (埋め込みサブセット) になっていれば問題なく仕上がっている。（図１０）

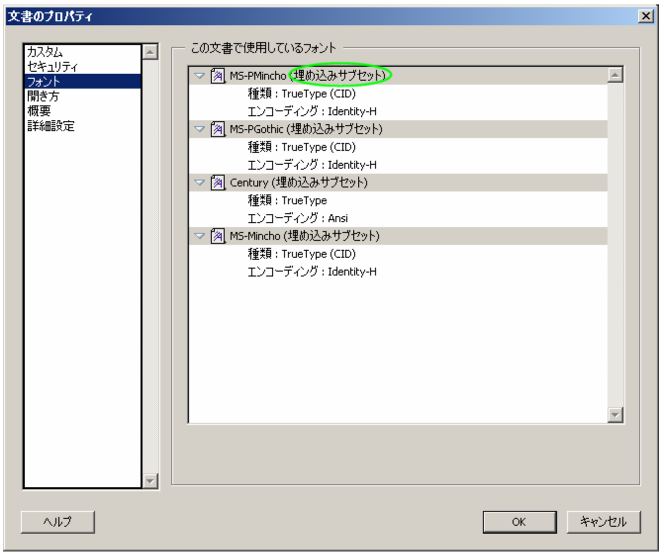


図１０

図１１の様に、様々なフォントが表示され、(埋め込みサブセット) が付いていない PDF file は閲覧するパソコンによって見え方が変わってしまったり、汚く見えてしまったりする。また、プリンタの種類によって非常に印刷結果が異なってしまう。これらは設定を見直し、全て (埋め込みサブセット) となるようにフォントの変更などをする必要がある。

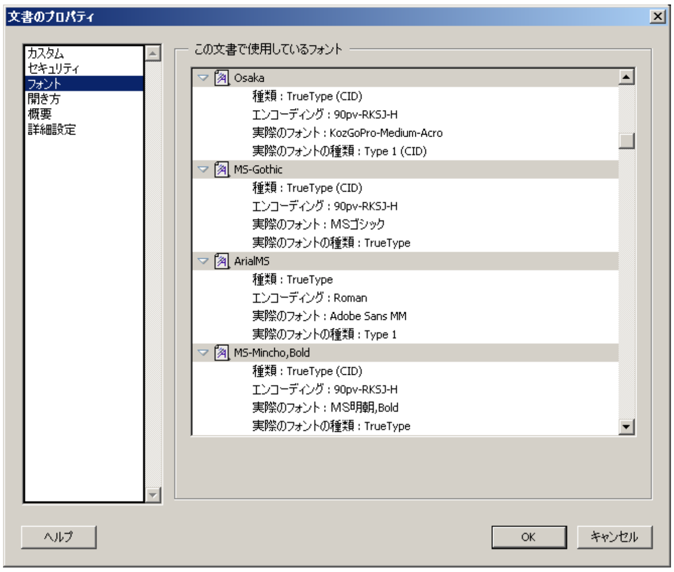


図１１

スキャナで撮った論文やイメージのみのデータ、又は文字データを出力できないアプリケーションソフトウェアで作成した PDF file のフォント情報を見ると、図１２の様に何も表示されない。これはオフセット印刷原稿と同様で見たままの PDF file であるが高解像度のプリンタや印刷機で印刷したときの印字品質が悪くなるし、PDF file のもっとも優れた機能の１つであるテキストによる検索が出来なくなってしまうのでこの様な表示になってしまった場合、原稿の作成段階から再検討が必要である。

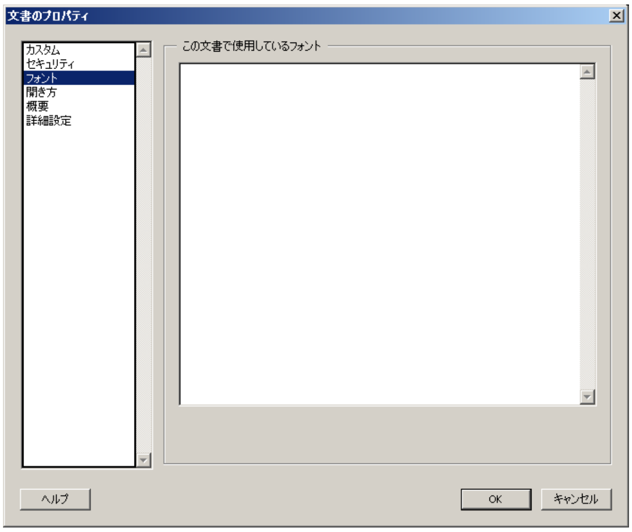


図１２

フォントの埋め込みをしなかった PDF file は一部の環境で図１３の様に指定されたフォントコードが無い事を表示され真っ白な画面になってしまうこともある。

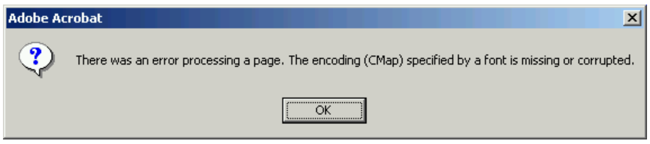


図１３

また、場合によっては「？」や「・」、「□」などに文字化けすることもある。

2.6 冊子印刷用に全ての論文をまとめる

結合する複数の PDF file のうち先頭に来るファイルをコピーし、ファイル名を all_report.pdf 等としてこのファイルを Acrobat で開く。ページタブを開き最終ページの下にエクスプローラから追加したいファイルをドラッグ＆ドロップする。（図１４）各論文のファイル名は名前の順ソートが容易なように 01.a.pdf , 02.b.pfd , 03.c.pdf 等と先頭に通し番号をふると都合がよい。

Acrobat 6.x の場合は、「複数のファイルから PDF を作成」ツールを利用すると非常に簡単に冊子状にまとめることができる。（図１５）

以下、実際の作業状態のスクリーンショットを図に示す。

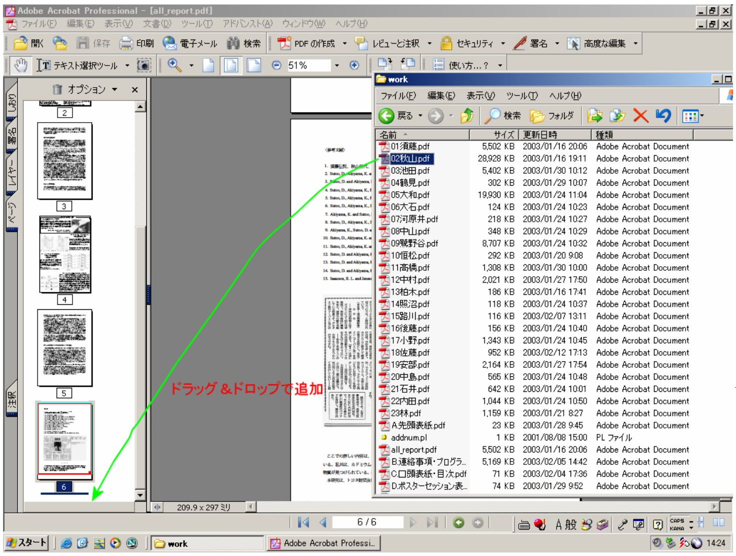


図１４

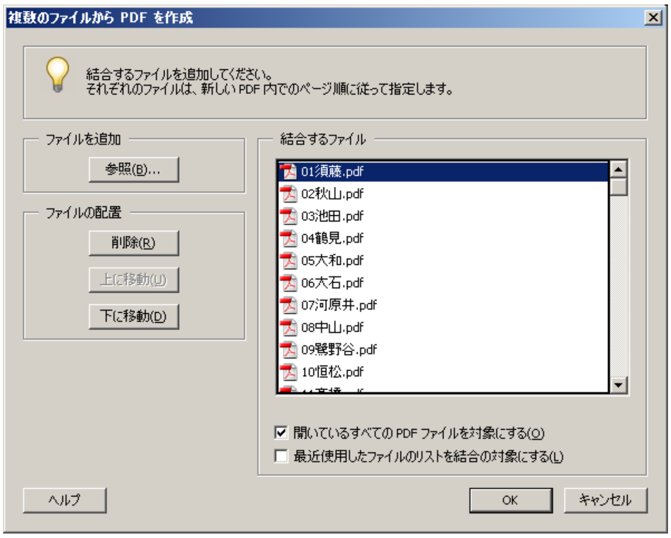


図１５

2.7 PDF → PostScript file に印刷

デジタル印刷業者にデータ提供する場合、Post Script file での提出を要求されることがあるので PDF file を PostScript file にする方法を示す。PostScript file に印刷するためには AdobePS プリンタドライバ[5]を出力ポートをFILE: にしてインストールする必要がある。図１６にドライバの詳細設定を示す。基本的に 2.4 での設定と同じである。

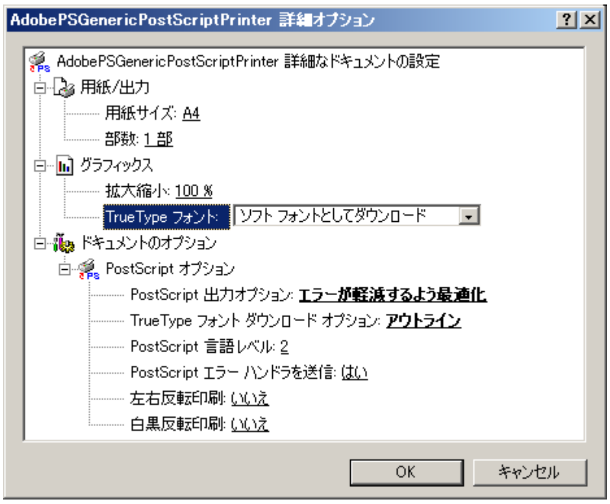


図１６

Acrobat で印刷させたい PDF file を表示させ、Adobe Generic Postscript Printer ドライバを使って（図１７） Post Script file に出力する。（図１８）

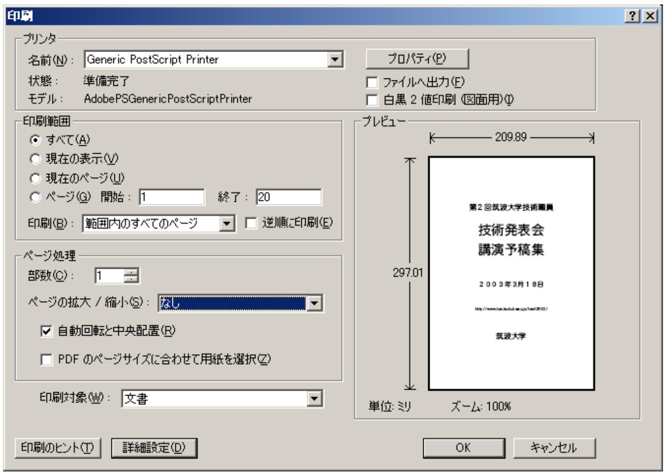


図１７

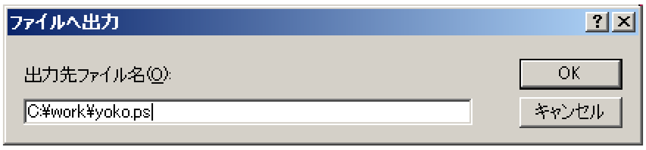


図１８

出来た Post Script file は、lpr などで Post Script プリンタに出力して問題ないかテストすると良い。

---

[5] http://www.adobe.co.jp/support/downloads/pspwin.html
http://www.adobe.co.jp/support/downloads/pspmac.html

2.8 冊子状になった PDF にページ番号付加

高価な PDF 編集ソフト(PitStop[6]等)を購入しなくてもページ番号を付加できる方法を紹介する。Adobe サポートデータベースの「Acrobat 5.0 （Mac/Win） : ページ番号の追加・編集ができない[7]」に載っていたサンプル JavaScript プログラムを Acrobat 6 でも使用可能なように筆者が modify したもの（リスト１）である。このプログラムを、テキストエディタで add-page-num.js 等として、Windows の場合

「Program Files¥Adobe¥Acrobat 6.0¥Acrobat¥JavaScripts」フォルダに、Mac の場合、

「Adobe Acrobat 6.0:JavaScripts」フォルダに保存すると、Acrobat の ［ツール］メニューに ［Acrobat Extras］が追加され、[Add Page Numbers] （図１９）を実行することでページ番号の付いた PDF file が作成できる。（図２０）

ただし、先頭数ページを i,ii,iii,iv 等としたい場合やページ番号無しのページを入れたい場合は別の PDF を作っておき後で結合するなど少し面倒である。

冊子状の PDF file を一度 2.7 の方法で Post Script file にして冊子全体のページ番号構造をファイル化したものを使ってページ番号付けをする Perl Script も作成しこれまで業務で使用してきたが紙面の都合上省略させて頂く。この方法を用いると、Acrobat の Version に関係なくページ番号付加が可能である。興味のある方は、筆者[8]に連絡して頂きたい。

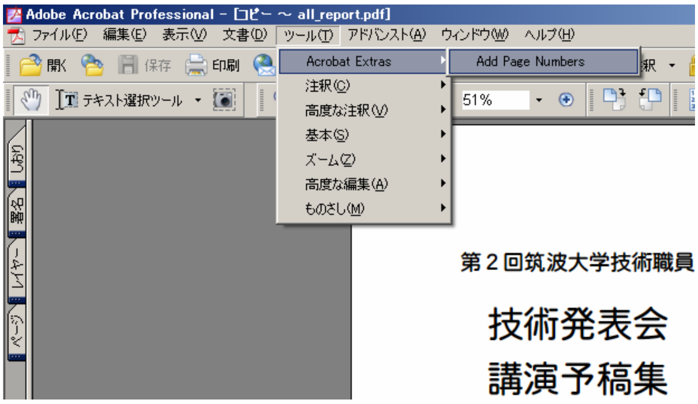


図１９

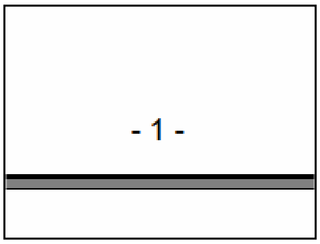


図２０

```
app.addSubMenu({ cName: "Acrobat Extras", cParent: "Tools"});
app.addMenuItem({ cName: "Add Page Numbers", cParent: "Acrobat Extras", cExec:" pageNumber()"});

function pageNumber() {
// app.execMenuItem("Save"); // QE measure
var numP = this.numPages
for (i=0;i<numP;i++) { // start loop through pages

var pRot = this.getPageRotation(i); // get the rotation of the page
var mBox = this.getPageBox("Media",i); // get the size of the page
var pNo = util.printf("- %.0f -", i + 1) // set page number to 0 based + 1, no decimal places

if (pRot == 90) { // check the page rotation and set the box for the annotation accordingly
var boxRect = [mBox[1]-30, 240, mBox[1]-10 ,mBox[2]-240]; // landscape
}
else {
var boxRect = [mBox[0]+240, 10, mBox[2]-240 ,30]; // portrait
};

var PRICEannot = this.addAnnot
({
page: i,
type: "FreeText",
textFont: "Helvetica",
textSize: 10,
alignment: 1,
rect: boxRect,
fillColor: color.white,
strokeColor: color.black,
width: 0,
name: "myFreeText",
contents: pNo,
rotate: pRot // no GUI for rotation
});
} // end loop through pages
};// end
```

リスト１

[6] http://www.swtoo.com/product/enfocus/product/pitstop50/pitstop_50.html
[7] http://support.adobe.co.jp/faq/faq/qadoc.sv?222400+002
[8] E-mail: yamato@tac.tsukuba.ac.jp　TEL: 029-853-6215

2.9 文書のタイトル・作成者等の設定

[文書のプロパティ] [概要] タブで設定。（図２１）

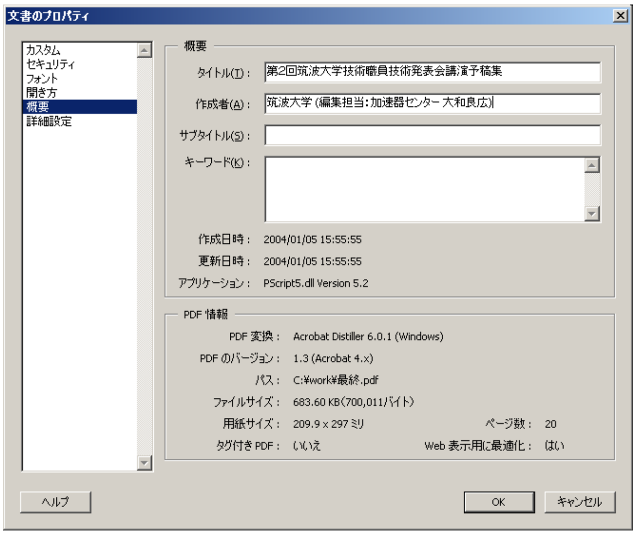


図２１

2.10 文書の開き方の設定

[文書のプロパティ] [開き方] で設定。（図２２）

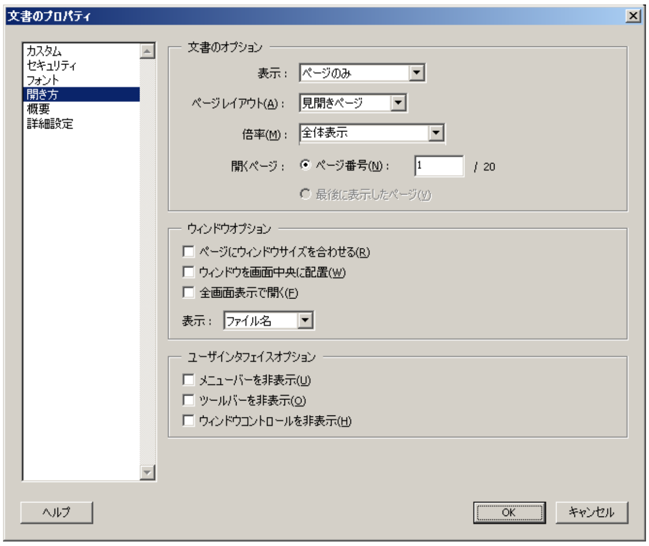


図２２

2.11 文書のセキュリティーの設定

最終的に出来た PDF file にセキュリティー設定を何もしないとその PDF file は文書内容の書き換えなどが出来てしまう状態である。印刷は許可、サーチエンジンによる検索語抽出のためにも内容のコピーや抽出は許可し、それ以外は強いパスワードで許可しないべきである。

[互換性のある形式] の設定は、web 掲載の際に見てもらう相手の環境と Acrobat Reader の Version をどの程度までターゲットとするかで判断し、適宜変更する。筆者の個人的な考えでは、[Acrobat 3.0 及びそれ以降] の PDF1.3 でほぼ全ての人が閲覧できるのでこれを基本とし、改変等からどうしても守りたい非常に重要な内容が含まれている場合にのみ [Acrobat 5.0 及びそれ以降] の PDF1.4 に設定すれば良いと考えている。図２３はパスワードによるセキュリティー設定の例。

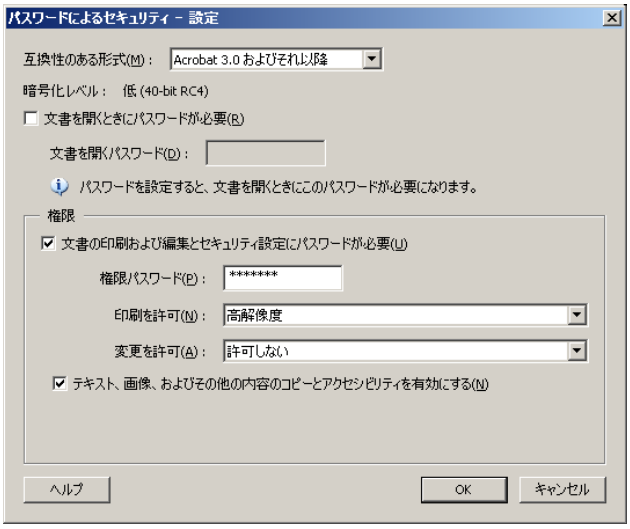


図２３

2.12 Acrobat による PDF file の保存

全ての作業終了後、「名前を付けて保存」を行うと冊子状 PDF 全体の無駄を省き、ファイルサイズを抑えた web 掲載用の PDF file ができる。

ただし、Acrobat 6.x の場合、普通に保存してしまうと自動的に PDF 1.5 という Acrobat 6 以降専用の形式になってしまう。Acrobat 4.x,5.x などと互換性を保つために［ファイルサイズを縮小］メニューで適宜形式を選んで保存しなければならない。（図２４）

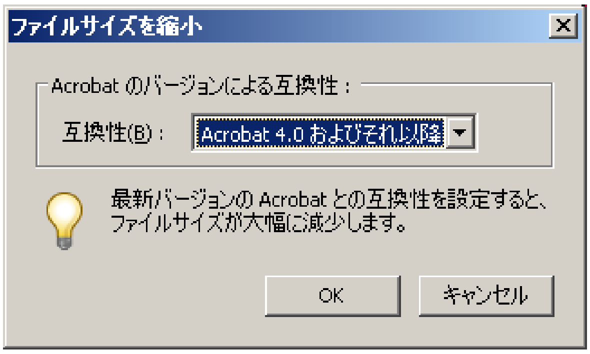


図２４

３．Open Office で PDF にする

Open Office 1.1[9] の「PDF としてエクスポート」機能で Adobe Acrobat を使用しなくても PDF file を簡単に作成することができる。

MS Word の文書も図の位置ずれなど若干修正の必要があるがほぼ問題なく読み込むことができ、UNIX 系の OS でもフォントを埋め込んだ再現性の高い PDF file が出力できた。2004 年 1 月現在、Windows,Linux,FreeBSD 版が利用可能である。無料で利用できる上、操作も簡単なので筆者はオフィス系標準ソフトとして浸透して行くことを願っている。

図２５は、FreeBSD 上の Open Office 1.1 で報告書テンプレートを PDF 化したものを Windows の Acrobat 6 でフォント情報を見た物である。フォントが埋め込まれているため FreeBSD で見たままの状態を Windows や Mac でも再現できる。

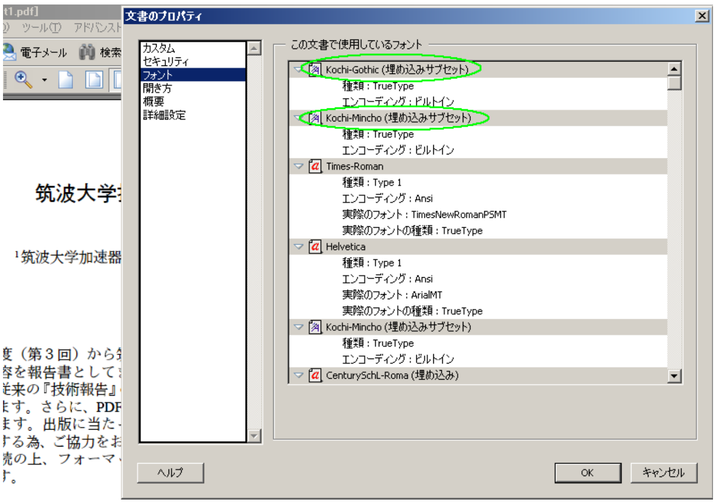


図２５

４．KEK 電子出版講習会受講報告

平成１５年７月２８日～８月１日まで KEK 技術部有志主催の電子出版に関わる講習会が開催された。これは、「平成１４年度東京大学総合技術研究会」において KEK の中島氏が「日本語環境での電子出版」という題目で発表を行った際、一部の出席者から KEK で電子出版に関する講習会を開催して欲しい旨の申し出があり KEK 濁川氏を中心に実現した物である。

内容としては、

・MS-Word による電子出版用テンプレート作成方法
・PDF ファイルの作成方法
・PDF ファイルの便利な使用方法
　(フォーム作成・リンク作成等)
・Acrobat5.0 による PDF ファイルの修正方法
・PitStop による PDF ファイルの修正方法
・会議等での電子出版作業の流れ
・英語文章の電子出版に関する注意と修正方法

など多岐にわたり、ソフトウェア (MS-Word,Adobe Acrobat,PitStop,LaTex2e 等) の扱い方、様々な問題点への対処方法を学習し、実習による高度な技術を取得できた。テキストが非常に優れており文書の電子化業務（特に英語論文）を行う場合には是非受講して頂きたい。

また、参加者及び講師のみなさんとの意見交換・技術交流が非常に有意義であった。ここに、講師の濁川和幸氏、白川明広氏、中島啓光氏、片桐広明氏、小菅隆氏、森丈晴氏に感謝すると共に KEK 技術部その他関係各位にお礼申し上げる。

５．まとめ

冊子印刷、web 掲載用の PDF file 作成の “要” を箇条書きにする。

- 原稿を作成した環境(Win/Mac)上で PDF 化する
- 印刷の為に図などのカラーは CMYK で作成
- Adobe PDF 又は Acrobat Distiller を使う
- フォントは埋め込む
- フォントのチェックを行う
- 印刷の為に解像度は 1200dpi 程度
- 文書のプロパティ[概要]などの設定をする
- web 掲載の為にセキュリティー設定をする
- web ダウンロード読者環境への配慮の為に PDF1.3 又は 1.4 で保存
- 印刷の為に Post Script file も作成

Windows のスクリーンショットを多用し論じてきたが Mac で作成する場合にも全く同じ“要”である。

将来電子文書フォーマットは、XML やもっと別の素晴らしい形式に移行するかもしれない。しかし、2004 年 1 月現在では、Adobe Acrobat による PDF file が最も再現性の保証された電子の紙と言える。多数の文書・図面・写真等の効率的保存ができ再現性が保証される点、また、膨大なファイルの中から検索を行えるという点を考えても PDF file の作り方を知ることは重要と考える。

Acrobat 3.x ～ 6.x まで使用してきたが、Acrobat 6 はこれまでの Version で難しかったフォントの埋め込みや多数文書の結合等が非常に簡単に出来るようになっている。筆者の今までの苦労は何だったのだろうと思うほどである。しかし、優れた物を簡単に作成できるようになるのは技術者にとっても喜ばしい事であろう。

この報告が、本学技術職員をはじめ web[10]からダウンロードされた多くの方々に活用されれば幸いである。

参考文献・参考 WEB URL

[1] 濁川和幸、白川明広、中島啓光、片桐広明、小菅隆、森丈晴 KEK 電子出版講習会テキスト http://www-eng.kek.jp/
[2] Adobe サポートデータベース http://support.adobe.co.jp/faq/faq/tfaqindex.sv
[3] Adobe サポート よくある質問 http://support.adobe.co.jp/faq/faq/pfaqindex.sv

9 http://ja.openoffice.org/download/mirrors.html

10 http://www.tac.tsukuba.ac.jp/tech2003/

中枢機能に対するスポーツの効果

須藤伝悦[1]、秋山佳代[2]
筑波大学人間総合等教育研究支援室（医学系）
〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

先に確立したメカニズムや分析技術を応用して動物実験を行い、日常の運動が中枢機能を介して高血圧症を改善する事を確認した。更に、ある種の老人性痴呆症やパーキンソン病などの神経変性疾患の予防と治療にも有効である事を示唆した。

１．はじめに

脳内で複雑に分布し、情報伝達系の主役を演じている神経伝達物質を定量的に分析することは、脳研究の中心的なテーマであり、様々な神経疾患の発症機序を解明する上でも極めて重用なことである。著者らは 20 年に渡り、その分析法と装置の開発を行い、様々な神経伝達物質の分布を細胞レベルで定量的にスキャンし、画像化する Brain Mapping Analyzer を完成した[1]。

この装置を用いて実験を重ね、日常の生活を通じて摂取されたカルシウムが、中枢のカルモジュリンを活性化し、タイロシン水酸化酵素（カテコルアミン合成の律速酵素）を燐酸化する事によって賦活化し、引き続き線条体や側坐核でドーパミン（神経伝達物質）の合成能を亢進する事を解明した[2-4]（図 1）。

この基礎的メカニズムを基に、中枢ドーパミン作動系に異常が示唆されている様々な疾病を分析し、新たな発症機序の解明や予防法と治療法を開発するための基礎的データを提供してきた[5-15]。その中で、てんかん症のモデル動物を調べてきたが、発作は体の動きを通して中枢の異常を改善するのに役立っており、てんかん症にとって必然的に要求される現象であるとする結論を導いた[5,7,15]。このことは、スポーツ等によって体を動かすことも、中枢機能を正常に維持する上で重要である事を示唆している。日常のスポーツが中枢機能に対して如何なる意義を持つのか、ドーパミンの合成系を通して考察してみる。

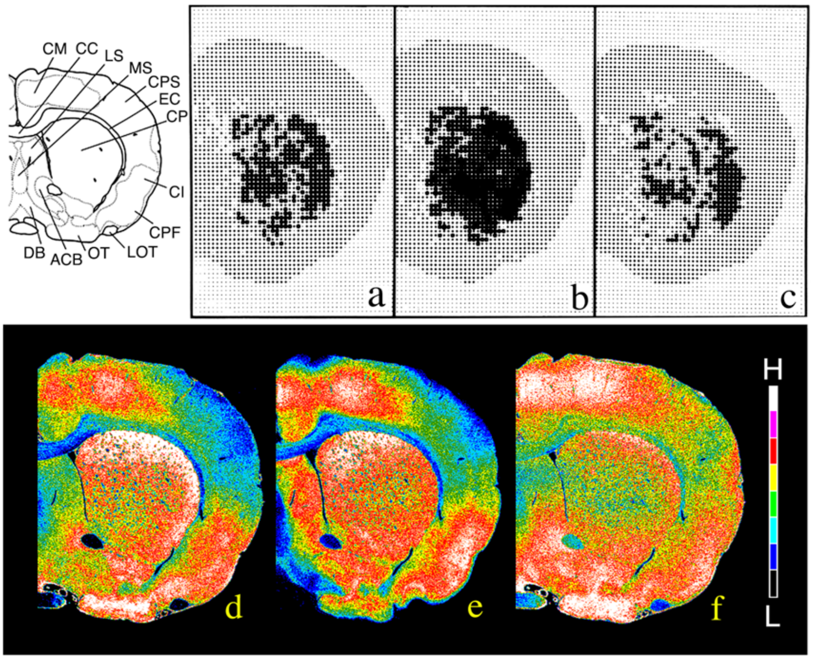


図 1.　カルシウム/カルモジュリン依存性のドーパミン合成系の調節

マウスの脳室内に生理食塩水 (a)、塩化カルシウム (b) 或いは塩化カルシウムとカルモジュリン拮抗剤の混合液 (c) を投与し、30 分後のドーパミンの分布を Brain Mapping Analyzer で分析した。カルシウムによって線条体外側と側坐核のドーパミンの合成が亢進するが、この効果はカルモジュリン拮抗剤によって抑制される。実験に使用した部位には、タイロシン水酸化酵素 (d)、カルモジュリン依存性プロティンキナーゼ II (e) 及びカルモジュリン (f) が、共に高濃度で分布している。これらのデータは、カルシウムがカルモジュリン依存系を介してドーパミンの合成系を調節していることを示している。(a-c: *Brain Res. Bull.* **22:** 565–569; d-f: *Brain Res.* **933:** 1–11 より引用)

[1] E-mail: dsutoo@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3113
[2] E-mail: akiyamak@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3330

2．てんかん発作に隠された意外な事実

EL マウスは、てんかん症のモデル動物として約 40 年間、日本を中心に研究されてきた。著者らも発作の発症機序を 20 年間に渡り分析し、以下の結論に達した。EL マウスは、カルシウム代謝系に異常があり、骨に保存されているカルシウムが充分に血液に供給されないため、脳への輸送が少なくカルモジュリンの活性が低下している。そのため、カルモジュリン依存性のドーパミンの合成が低下し、レベルの低くなったドーパミンが発作や異常行動を誘発する[5]。

EL マウスにカルシウムを補給すると、異常行動を抑える事から、カルシウム代謝系を改善する事が中枢の異常を改善すると考えられる。ここに予防法や治療法の開発のカギが隠されていると示唆される。そして、EL マウスの発作自体が、カルシウムの代謝系を改善し、血中カルシウムレベルを高め、脳内ドーパミンレベルを改善し、異常行動を抑える事を確認した[7,15]。発作は、中枢のドーパミンが減少した時に発症するが、発作自体が異常な現象ではなく、中枢の異常を改善するために、要求される二次的なものと考えられる（図２）。最近では、人間の子供の場合も発作後、異常脳波が消失するとの臨床報告がなされている。

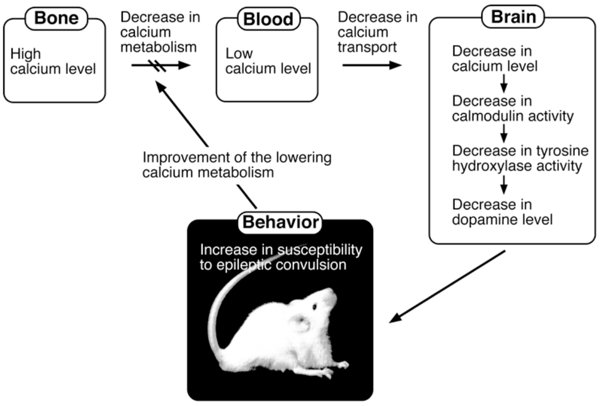


図２．てんかんマウスに見られる痙攣発作

骨に保存されているカルシウムが血液に充分補給されないために、脳ドーパミンの合成が低下し、痙攣発作などの異常行動を誘発する。しかし、この痙攣発作は、カルシウムの代謝を改善し、脳内のカルシウム依存性ドーパミンの合成を亢進し、中枢の異常を改善する。

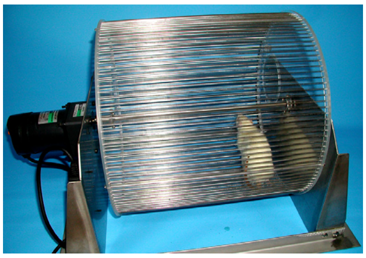
(*Physiol. Behav.* **52:** 865-872; *Neurobiol. Dis.* **13:** 1-14 より引用)

3．中枢機能に対する運動の効果

てんかん症に見られる痙攣発作は、ドーパミン作動性伝達系の機能を改善するのに役立っている現象であると考えられる。このことは、ドーパミン作動系に異常がみられる疾病の諸症状を改善するために、痙攣発作によって誘導される動きのように、体を動かす事が有用であると推察される。

そこで、カルシウム/カルモジュリン依存性ドーパミンの合成能に対する歩行運動の効果を分析してみた。回転カゴを用いて健常マウスを毎分 20 m の速度で強制的に歩行させると、歩行開始 15 分後に血液中のカルシウムが有意に増加する。これが全身を循環することによって、脳内でも 60 分後に有意に増加し、引き続き脳内のドーパミンの合成が亢進する（図３）。その結果、ドーパミンに依存する様々な行動や中枢機能に変化がみられる[16,17]。

ラットでも、同じ結果が再現され、歩行運動は血中カルシウムと脳内ドーパミンレベルを高める事が確認された[18]。この事は、正常な中枢機能を維持する上で日常の運動が重用である事を示唆している[19]



強制歩行装置

ラットやマウスに一定の速度で強制的に運動を負荷する装置

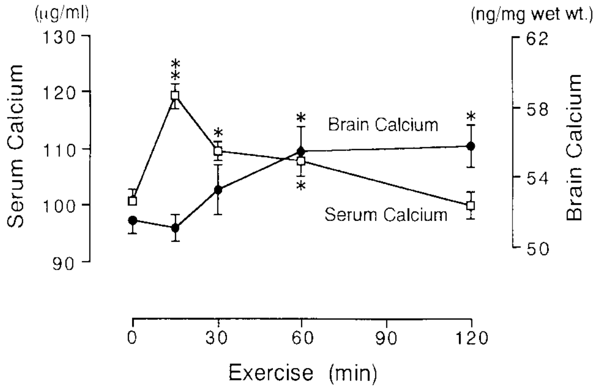


図３．運動によるカルシウムレベルの変動

強制運動によって健常動物でも、血中のカルシウム濃度が一過性に上昇し、間もなく元のレベルに戻る。増加したカルシウムが全身に供給され、脳内でも有意に増加し、ドーパミンの合成を亢進する。*p<0.05; **p<0.01、非運動群と比較 (Dunnett's t-test)

(*Physiol. Behav.* **60:** 177-181; *Pharmacol. Biochem. Behav.* **66:** 771-778 より引用)

4．日常の運動が高血圧症を予防する

カルシウムには、血圧調節において二つの対立する作用があるが（別報参照）、その一つが中枢のドーパミン合成系を介した降圧作用である。自然発症高血圧ラット (SHR) の高血圧症は、脳内ドーパミンレベルの減少が発症原因の一つと考えられ[8]、カルシウムの投与によってドーパミンレベルが改善し、血圧が降下する[12]。歩行運動はカルシウム依存性のドーパミン合成系を賦活化するので、高血圧症を改善する事が期待されるので確認した。

SHR を毎分 10 m の速度で 1 時間歩行させると、歩行終了後 30 分から 3 時間以上に渡り血圧が有意に降下する（図４）。この運動の効果は、カテコルアミンの合成酵素阻害剤、カルシウムキレート剤或いはドーパミン D_2 レセプター阻害剤の何れかの投与によって抑制されるが、ドーパミン D_1 レセプター阻害剤によっては変化が見られない（図５）。この結果より、運動によって増加したカルシウムが中

枢カルモジュリン依存系を介してドーパミンの合成を高め、レベルの高くなったドーパミンが D_2 レセプターを介して血圧調節中枢に作用し、交感神経系を抑制する事によって血圧を降下させると考えられる[18]。最近こうした研究を基に、各国で日々の運動によって高血圧症を予防・改善する試みが始まっている[19]。

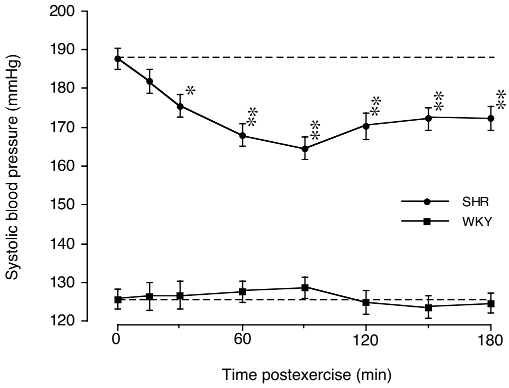


図４．　歩行運動による血圧の変動

SHR の血圧は、1 時間の強制的な歩行運動後 30 分から 3 時間以上に渡り有意に降下し、その後運動前のレベルに戻る。健常ラット WKY（SHR の母系）は、同じ運動量でも有意な変化は見られない。*p<0.05; **p<0.01、0 時間と比較 (Dunnett's *t*-test)
(*Brain Res.* **823:** 154-160 より引用)

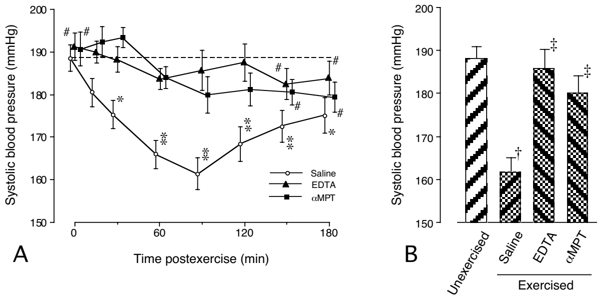


図５．　歩行運動に依存した降圧反応に対する薬物の効果

SHRの歩行運動に依存した降圧反応は、カルシウムキレート剤（EDTA）やタイロシン水酸化酵素阻害剤（αMPT）等によって抑制される事より、中枢カルシウム/カルモジュリン依存性ドーパミンの合成系を介した反応であると示唆される。
A: 運動後の血圧値の変動
*p<0.05; **p<0.01、0時間と比較；# 生理食塩水投与群と比較して有意差ない (Dunnett's *t*-test)
B: 運動後90分の血圧値
†p<0.01、非運動群と比較；‡p<0.01、生理食塩水投与群と比較 (Newman-Keuls *t*-test)
(*Brain Res.* **823:** 154-160 より引用)

５．日常の運動が痴呆症等の予防に有効

パーキンソン病は、線条体ドーパミンの異常な減少が発症の原因と考えられている。老人性痴呆症の一つである DLB 型痴呆症（アルツハイマー型について、２番目に多いタイプ）も、線条体ドーパミンに異常な減少が見られる。上の動物実験から、日常の運動が、こうした神経変性疾患の予防と治療にも有効である事が示唆される。15 年位前から、様々な国際会議や論文を通して、この考えを述べてきた。各国で、こうした患者の症状を和らげるため、運動療法が試され始め、良好な結果が報告されている[19]。

幾つかの報告を紹介する。棒またぎ運動、ストレッチ運動、上半身の空手訓練、トレドミル運動、山歩きなどの種々の運動は、パーキンソン病患者の機能障害、認知機能、日常の生活動作、精神状態を改善する。さらに、日常の運動は、疾病の程度とは関係なくパーキンソン病患者の死亡率を低下させる。一方、痴呆症患者に歩行運動や自転車こぎ運動をさせると、認知機能や栄養状態が改善し、転倒や問題行動も減少する。65 歳以上の四千人以上の男女についての追跡調査では、運動したグループにおける痴呆症の発症率が、運動しないグループの半分程度に減少していることを報告している。

６．まとめ

日常のスポーツは、血液中のカルシウムレベルを高める。このカルシウムが全身を循環することによって脳内でも増加する。引き続き、カルモジュリン依存系を介して中枢ドーパミンの合成が亢進し、レベルの高くなったドーパミンが様々な機能を調節する。これらの研究から、中枢ドーパミンの減少が発症原因の一つと考えられる高血圧症、パーキンソン病、DLB 型痴呆症等の予防と治療に、スポーツが有効である可能性が示唆される（図６）。

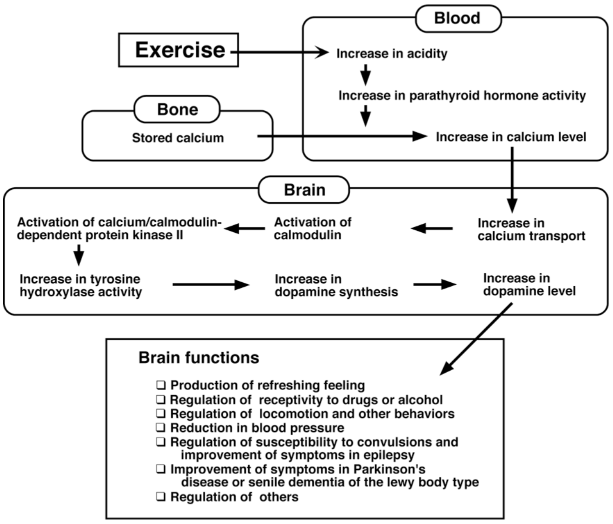


図６．　中枢機能に於けるスポーツの役割

日常のスポーツは、血液中のカルシウムレベルを高め、全身に供給する。引き続き中枢では、カルモジュリン依存性のドーパミンの合成能が亢進し、レベルの高くなったドーパミンが様々な機能を調節する。高血圧症、パーキンソン病、DLB 型痴呆症等は、ドーパミンの減少が発症原因の一つであるため、スポーツを通して諸症状を改善することが期待される。
(*Neurobiol. Dis.* **13:** 1-14 より引用)

参考文献

[1] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, Quantitative mapping analyzer for determining the distribution of neurochemicals in the human brain, J. Neurosci. Methods 85 (1998) 161-173.

[2] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Iimura, Effect of calmodulin antagonists on calcium and ethanol-induced sleeping time in mice, Pharmacol. Biochem. Behav. 23 (1985) 627-631.

[3] D. Sutoo, K. Akiyama, M. Geffard, Central dopamine-synthesis regulation by the calcium-calmodulin-dependent system, Brain Res. Bull. 22 (1989) 565-569.

[4] D. Sutoo, K. Akiyama, K. Yabe, Comparison analysis of distributions of tyrosine hydroxylase, calmodulin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a triple stained slice of rat brain, Brain Res. 933 (2002) 1-11.

[5] D. Sutoo, K. Akiyama, H. Takita, The relationship between metal ion levels and biogenic amine levels in epileptic mice, Brain Res. 418 (1987) 205-213.

[6] D. Sutoo, K. Akiyama, H. Takita, Behavioral changes in cold-stressed mice related to a central calcium-dependent-catecholamine synthesizing system, Pharmacol. Biochem. Behav. 40 (1991) 423-428.

[7] D. Sutoo, K. Akiyama, H. Takita, The effect of convulsions on the rectification of central nervous system disorders in epileptic mice, Physiol. Behav. 52 (1992) 865-872.

[8] D. Sutoo, K. Akiyama, T. Matsukura, R. K. Nakamoto, Decrease of central dopamine level in the adult spontaneously hypertensive rats related to the calcium metabolism disorder, Brain Res. Bull. 30 (1993) 107-113.

[9] D. Sutoo, Disturbances of brain function by exogenous cadmium, In: R. L. Isaacson and K. F. Jensen (Eds.), The Vulnerable Brain and Environmental Risks, Vol. 3: Toxins in Air and Water, Plenum, New York, 1994, pp. 281-300.

[10] D. Sutoo, K. Akiyama, Regulation of blood pressure with calcium-dependent dopamine synthesizing system in the brain and its related phenomena, Brain Res. Rev. 25 (1997) 1-26.

[11] D. Sutoo, K. Akiyama, A. Matsui, Gastric ulcer formation in cold-stressed mice related to a central calcium-dependent-dopamine synthesizing system, Neurosci. Lett. 249 (1998) 9-12.

[12] D. Sutoo, K. Akiyama, Effect of dopamine receptor anatagonists on the calcium-dependent central function that reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats, Neurosci. Lett. 269 (1999) 133-136.

[13] D. Sutoo, K. Akiyama, Effect of cadmium or magnesium on calcium-dependent central function that reduces blood pressure, Arch. Toxicol. 74 (2000) 1-4.

[14] D. Sutoo, K. Akiyama, Neurochemical changes in mice following physical or psychological stress exposures, Behav. Brain Res. 134 (2002) 347-354.

[15] D. Sutoo, K. Akiyama, The significance of increase in striatal D_2 receptors in epileptic EL mice, Brain Res. 980 (2003) 24-30.

[16] D. Sutoo, K. Akiyama, The mechanism by which exercise modifies brain function, Physiol. Behav. 60 (1996) 177-181.

[17] M. Hanawa, T. Asano, K. Akiyama, K. Yabe, K. Tsunoda, T. Tadano, D. Sutoo, Effect of Zena F-III, a liquid nutritive and tonic drug, on the neurochemical changes elicited by physical fatigue in mice, Pharmacol. Biochem. Behav. 66 (2000) 771-778.

[18] K. Akiyama, D. Sutoo, Rectifying effect of exercise on hypertension in spontaneously hypertensive rats via a calcium-dependent dopamine synthesizing system in the brain, Brain Res. 823 (1999) 154-160.

[19] D. Sutoo, K. Akiyama, Regulation of brain function by exercise, Neurobiol. Dis. 13 (2003) 1-14.

痴ほう・パーキンソン病予防

カルシウムと運動 有効

海藻や牛乳などカルシウムが豊富な食事や日々の運動が、パーキンソン病や痴ほう症の治療や予防に役立つことを筑波大医学系の須藤伝悦博士らが動物実験で初めて明らかにした。生活習慣の大切さが改めて注目されそうだ。

手足のふるえや筋肉硬直などが特徴のパーキンソン病や、痴ほう症のうちでパーキンソン病に似たDLB型、高血圧症、てんかん症などは、脳内の情報伝達に使われる物質の一種ドーパミンが減ってしまうことがその一因になっている。

筑波大博士ら実験

須藤博士らはネズミを使った実験で、餌として摂取したカルシウムが、脳内のドーパミン合成を実際に促進する仕組みを突き止めた。また、毎日の運動で、体内のカルシウム代謝が活発化し、骨の中のカルシウムが血流を通じて脳に供給され、ドーパミンが増えることも分かった。

海外では近年、山歩きや散歩、ストレッチなどの運動を一か月程度続けると、パーキンソン病や痴ほう症が改善したとする報告が増えている。また約四千三百人を追跡調査した海外の研究では、運動習慣がある人は、ない人に比べて痴ほう症になる割合が半分程度だった。

本研究を紹介してくれた読売新聞夕刊
（2003 年 6 月 24 日）

デジタルカメラを用いた螢光撮影装置の開発

鷺野谷秀夫
病院部医事課中央診療事務係
〒305-8576 茨城県つくば市天久保 2-1-1

1．はじめに

蛍光撮影とは、紫外線や X 線等の波長の短い光線を被写体に照射し、それによりその物質が励起状態となって、自ら光を放出する現象をカメラで撮影することである。その撮影により得られた画像は、肉眼では観察しにくいため、新知見を得ることが多い。

しかし、その撮影には、特殊な高感度フィルムやフィルターが必要となるため、迅速な観察が困難であった。今回、最近飛躍的に開発の進んでいるデジタルカメラを利用し、蛍光撮影装置を開発した結果、迅速かつ正確に蛍光画像を得ることができたので報告する。

2．方法と結果

今回は、キャノンデジタルカメライオス D30 を蛍光撮影に応用した。レンズは、100mm マクロレンズを用い、390nm 以下を吸収するシャープカットフィルターと 520nm 以下を吸収するシャープカットフィルターを装着した。励起光としては、360nm にピークを持つ紫外線透過可視光吸収フィルターを用いた紫外線特殊ストロボを用いた。図 1 は、蛍光撮影法を示す。撮影は、被写体に 360nm の紫外線を照射し、それにより励起された物質が自ら光を放出し、その光を 390nm または 520nm のフィルターで紫外線を遮断して撮影する方法を示す。図 2 は、今回用いた光源の分光吸収曲線と、レンズの先端に使用するシャープカットフィルターの分光吸収曲線を示す。

図 3 は、今回開発したデジタル蛍光撮影装置の本体を示す。撮影に際しては暗室内で行うため、被写体にピントを合わせるため、紫外線ストロボの上部に小型ライトを装着した。その光量は、撮影した画像に影響を与えない様に、明るさを青いフィルターで調整し装着した。

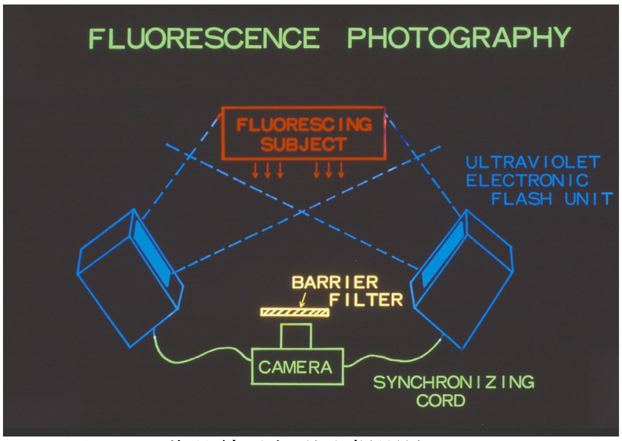


図 1．紫外線励起蛍光撮影法

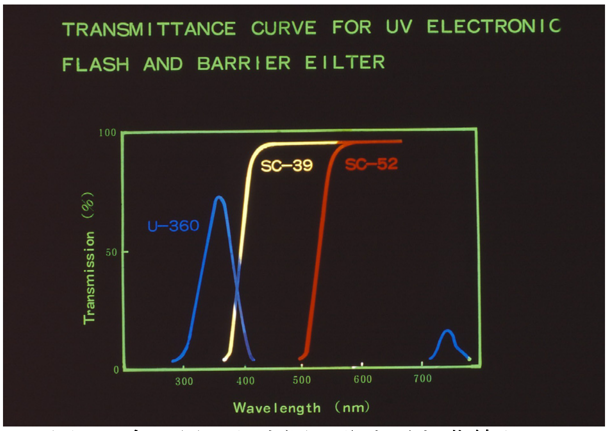


図 2．今回用いた光源の分光吸収曲線と、レンズの先端に使用するシャープカットフィルターの分光吸収曲線

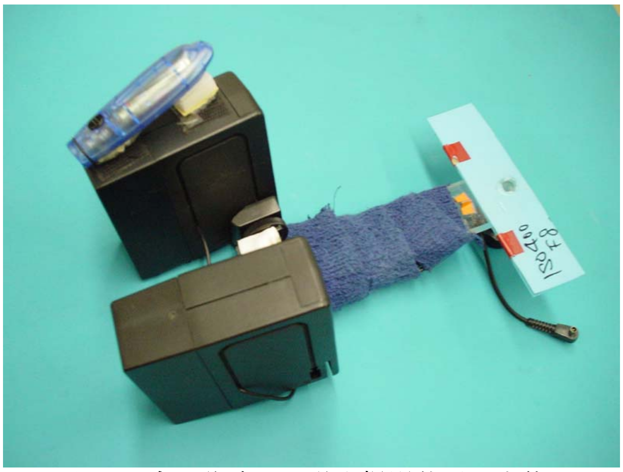


図 3．今回作成した蛍光撮影装置の本体

390nm のフィルター使用による撮影は、撮影を迅速に行うため、ケンコー製 UV カットフィルター(SL-39)の紫外線吸収フィルターをレンズの先端に常時用いた。520nm 以上の蛍光撮影では、コダック製ゼラチンフィルターの四角いものを用い、紫外線ストロボの間に挟んで使用した。本体とカメラは、アクリル板をカットし、キャノンイオス 100mm マクロレンズの先端が紫外線ストロボの中央に位置するよう調整した。また、カメラと本体は、三脚の固定ねじで固定した。

図 4 は、今回開発したデジタル蛍光撮影装置を示す。撮影を安定させるため、レンズの下部にアクリル板を使用し、さらに布をまいて感触性をよくした。カメラの操作は、オートフォーカスが使用できないためピント合わせを固定し、撮影倍率を一定にして撮影を行った。そのため、被写体と紫外線ストロボ、そしてフィルムの位置が常に一定した距離を保つこ

となって、蛍光の発光量を計測するのにより正確な撮影を可能とした。

図 4. 今回開発したデジタル蛍光撮影装置

図 5 は、口腔科患者の病態撮影で、臨床診断は、扁平上皮癌である。撮影は、同様のキャノンデジタルカメライオス D30 とマクロリングライト MR-14EX を用いた通常撮影である。

図 5. 口腔科患者の通常撮影

図 6 は、図 5 と同様の部位を今回開発したデジタル蛍光撮影装置で撮影した蛍光画像である。この画像は、ケンコー製 UV カットフィルター(SL-39)の紫外線吸収フィルターをレンズの先端に用いた蛍光撮影像である。この蛍光像には、390nm 以上の蛍光写真の特徴であるピンク色の蛍光がよく示されている。

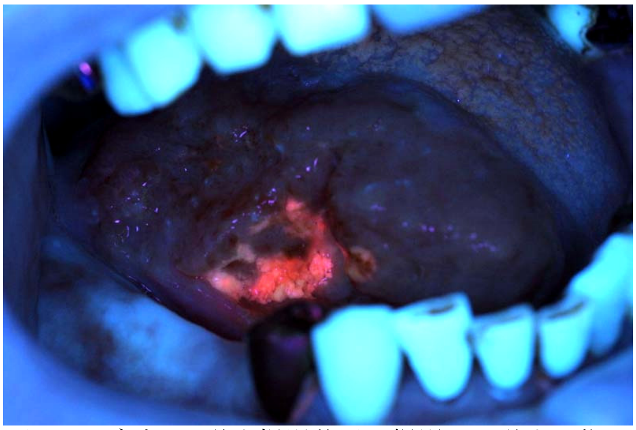


図 6. デジタル蛍光撮影装置で撮影した蛍光画像

図 7 は、同様に 520nm 以上のコダック製ゼラチンフィルターを用いて撮影した蛍光画像である。この蛍光像には、病変部に強力な赤色調の蛍光が鮮明に撮影されている。

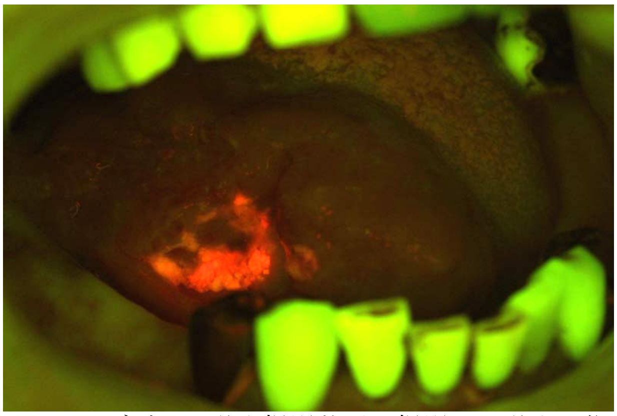


図 7. デジタル蛍光撮影装置で撮影した蛍光画像

図 8 は、皮膚科患者の病態撮影で、可視光による撮影である。撮影は、同様のキャノンデジタルカメライオス D30 を用い、一般のフラッシュ光源で撮影した通常撮影である。

図 8. 皮膚の病態撮影

図 9 は、図 8 と同様の部位を今回開発したデジタル蛍光撮影装置で撮影した蛍光画像である。この蛍光画像は、図 6 の口腔内の蛍光画像同様に 390nm 以上の蛍光写真の特徴である爪などの蛍光がよく示されている。

図 9. デジタル蛍光撮影装置で撮影した蛍光画像

図 10 は、図 8 と同様の部位を 520nm 以上のフィルターを用いてデジタル蛍光撮影装置で撮影した蛍光画像である。この画像においても、肥厚した皮膚に一致した部位に強力な蛍光が鮮明に観察され、蛍光画像の特徴をよく示している。

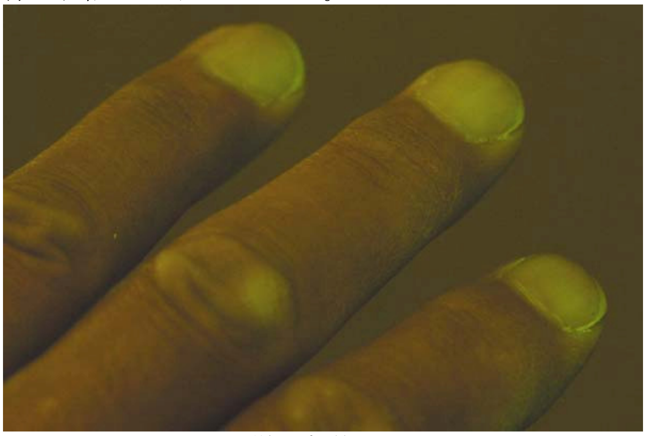


図 10. 図 8 と同様の部位を 520nm 以上のフィルターを用いてデジタル蛍光撮影装置で撮影した蛍光画像

通常のフィルムでは、ISO 感度を高くすると著しく画像が劣化し、粒子も荒れて解像度が落ちる。また、カラーバランスも悪くなるため、デジタルカメラにおいても同様の感度設定実験を行った。図 11 は、デジタルカメラの感度設定を 100 にし、通常のフラッシュで撮影したマクベスのカラーチェッカーである。図 12 は、同様にマクベスのカラーチェッカーを

図 11. 感度設定 100 のマクベスカラーチェッカー

図 12. 感度設定 1600 のマクベスカラーチェッカー

感度設定 1600 で撮影した画像である。図 11, 12 ともシャッター速度は 125 分の 1 秒と同様であるが、絞りは図 11 が F9.5、図 12 は F32 で撮影をおこなった。画像を観察すると、図 11、図 12 とも肉眼的には色彩の差は感じられず、コントラストの違いも感じ

図 13. 感度設定を 100 にした超拡大図

られなかった。

図 13 は、デジタルカメラの感度設定を 100 にし、通常のフラッシュで撮影した皮膚病変の拡大写真である。図 14 は、同様に感度設定を 1600 に設定して撮影した拡大写真である。画像は、写真の劣化を観察するため、画像の一部を 10 倍に拡大し、その部分を示したものである。図 13 と、図 14 を観察すると、フィルムに見られるような粒子の荒れは観察できず、肉眼では差を感じられない画像を示している。

図 14. 感度設定を 1600 にした超拡大図

3. 考察

癌組織から発行する蛍光は、我々が 1982 年に、胃癌で始めて観察し、その後、多くの研究結果を報告してきた。また、口腔内に見られた扁平上皮癌のピンク色の蛍光も、1986 年に発見し、多くの報告をしてきた。しかし、その後の研究は、著しい発展は見られず、発行物質の解明等も、まだなされていないのが現状である。その原因のひとつに、撮影装置の開発が遅れ、一般に市販されなかったことが考えられる。通常の研究者が一般のカメラを利用し撮影を行おうとすると、たいへんなデータと技術が要求さ

れてしまう。そのため、研究者が実際に撮影を行っても、画像を得ることができず、また、画像を得ることができたとしても不正確であったため、適正なデータを出すことが十分にできなかったことが要因と考える。そのため、多くの研究者が簡単に正確な撮影のできる蛍光撮影装置の開発は、必要であると考える。

人体における蛍光は、非常に微かなため、通常のカメラに超高感度フィルムを用いても、撮影は困難である。特に手持ちによる患者撮影では、ピントを合わせることがたいへん難しく、正確な画像を得ることが困難である。最近デジタルカメラは、より高性能のCCDの開発によって､飛躍的に発展している。これらのデジタルカメラは、フィルムの現像を必要としないため、画像の比較にたいへん適しているため、医学などの科学写真分野にとって、最も適したカメラである。さらに、デジタルカメラは、画像のファイリングが容易で、コンピューターを用いた解析等に応用が簡単なため、今後科学写真の主流になるものと考える。

実際の患者撮影に応用した結果は、フィルムによる撮影同様正確で詳細な画像が得られた。また、通常の撮影から口腔内の撮影まで多くの撮影状況で応用が可能であった。今回の結果から、今後の蛍光撮影は、デジタルカメラでも十分応用が可能で、以前のフィルムを用いた撮影以上の画像が期待できるものと考える。

蛍光撮影でもっとも困難なことは、非常に微かな固有蛍光を撮影するため、感度の高いフィルムを使用しなければならないことである。しかし、今回用いたデジタルカメラは感度設定が ISO100 から ISO1600 までと感度範囲が広く使えるため､微かな蛍光撮影の応用にはたいへん適していた。また、感度設定における画像の変化を実験した結果も、肉眼的に大きな変化は感じられず、たいへん良好な結果を示した。

4． 結論

今回、蛍光撮影装置を開発し、蛍光撮影法をデジタルカメラに応用した結果、迅速に正確な蛍光撮影を行うことができた。その、蛍光デジタルカメラを用いて、口腔科と皮膚科患者に対して蛍光撮影を行った結果、癌の範囲に一致して強力な赤色調の蛍光像を撮影することができた。

今後、この方法を多くの分野に応用し、研究すれば、多くの新知見が得られ発展するものと確信する。

参考文献

[1] 鷺野谷秀夫，他．特殊撮影の臨床における応用，日医写会誌 18 (1981) 76-78.

[2] 鷺野谷秀夫，他．特殊撮影の皮膚科学における応用，日医写会誌 19 (1981) 14-17.

[3] 鷺野谷秀夫，他．胃癌における紫外線励起蛍光観察，Progress of Digestive Endoscopy 20 (1982) 110-113.

[4] 鷺野谷秀夫，他．消化管粘膜における蛍光観察，日医写会誌 20 (1982) 191-195.

[5] 鷺野谷秀夫．特殊写真の臨床応用について，日医写会誌 23 (1985) 110-128.

[6] 鷺野谷秀夫，他．口腔における紫外線励起固有蛍光撮影法について，日口科誌 35 (1986) 210-215.

[7] 鷺野谷秀夫，他．紫外・赤外・蛍光撮影おける Gray Scale 作成について，日医写会誌 22 (1985) 128-140.

[8] 鷺野谷秀夫，他．紫外線撮影用レンズ UV ニッコール 105m 使用による皮膚病変撮影について，日医写会誌 23 (1985) 44-48.

[9] 鷺野谷秀夫，他．紫外線カラー写真の試み，日医写会誌 24 (1986) 2-9.

[10] 鷺野谷秀夫, 他. 内視鏡における蛍光撮影法について，日医写会誌 24 (1986) 159-165.

[11] 鷺野谷秀夫，他．口腔癌の紫外線励起蛍光撮影，日医写会誌 25 (1987) 2-6.

[12] 鷺野谷秀夫，他．患者撮影時における蛍光撮影装置の開発、日医写会誌 2 (1987) 11-18.

[13] 鷺野谷秀夫，他．インスタントカメラによる蛍光写真撮影法，日医写会誌 25 (1987) 70-76.

[14] 鷺野谷秀夫，他．スチルビデオカメラとミノルタ画像処理システムによる蛍光画像解析，日医写会誌 26 (1988) 93-100.

[15] 鷺野谷秀夫，他．扁平上皮癌における蛍光色の分析，日医写会誌 27 (1989) 188-196.

[16] K. Onizawa, H. Saginoya, et al., Fluorescence photography as a diagnostic method for oral cancer. Cancer Letters 108 (1996) 61-66.

[17] K. Onizawa, H. Saginoya, et al., Usefulness of fluorescence photography for diagnosis of oral cancer. Oral & Maxillofacial Surgery 28 (1999) 206-210.

[18] K. Onizawa, H. Saginoya, et al., Chromatic analysis of autofluorescence emitted from squamous cell carcinomas arising in the oral cavity: a preliminary study. Oral & Maxillofacial Surgery 29 (2000) 42-46.

[19] K. Onizawa, H. Saginoya, et al., Characterization of autofluorescence in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncology 39 (2003) 150-156.

超並列型 MR マイクロスコープ用プローブの製作

○保谷　博[1]、大石健一、河原井勝一
筑波大学生命情報等教育研究支援室（物理工学系）
〒305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

NMR イメージング研究室の研究の一つに、超並列型 MR マイクロスコープにより数千体のヒト胚子を三次元撮像し、デジタルデータとして永久に保存するとともに世界に公開する京都 4000 プロジェクトがある。
我々は、三次元の撮像をするうえで大変重要な部分の一つである、プローブの開発に数年にわたり関わっている。プロジェクトの第一期も後半に入り数百体以上の撮像が完了し、プロジェクトは順調に進行している。今後第二期、第三期とプロジェクトは進行して行くが、超並列型 MR マイクロスコープの研究開発に関わった報告とする。

１．はじめに

京都大学大学院医学研究科附属先天異常標本センターに保存されている、数万体のヒト胚子のうち、代表的な数千体を三次元 MR マイクロスコープで撮像しデジタルデータとして永久に保存するとともに世界中の研究者に公開しようというプロジェクト「Kyoto Human Embryo MR Microscopy Project（京都 4000 プロジェクト）」がある。大量のサンプルを、効率よくマイクロスコープで撮像したい欲求が今後ますます増大して行くと思われる。ところが、現存の MR マイクロスコープは、これに対応できないため、新しいアプローチが必要である。
この要求に対し、我々は、個別に RF シールドを行った複数の RF コイルに、それぞれ勾配コイルを装着し、それらを、均一で広い静磁場領域において、協調的に動作することにより、撮像効率を飛躍的に向上させることが出来る、超並列型 MR マイクロスコープの独自システムの開発に関わった。高い分解能で MR マイクロスコープ撮像を行うには数時間以上の時間と撮像のための精密な機器のコントロールが必要である。撮像時の時間と労力の軽減にはプローブの数を増やすことが効率向上には必須である。現在研究室独自のシステムの開発により 4 倍から 8 倍の効率向上を達成している。

２．超並列型 MR マイクロスコープの概要

2.1 NMR イメージング（MRI）とは？

体の内部などを、磁場の中で起こる電磁波（場）との共鳴現象（NMR）により可視化する手法で、1980 年代の半ば頃から実用化された医学診断装置で、人体各部の断層像や三次元画像が取得できる。放射線被爆がなく、さまざまな生体情報が得られるため、現在、もっとも注目される画像診断装置であり、病院などで広く使われている

2.2 MRI の原理

撮像対象を均一な静磁場の中に置き、RF パルス（回転磁場）を加えて NMR 信号を発生した後、x、y、z 方向にそれぞれ静磁場強度が変化するような勾配磁場をパルス的に加える。この操作により、NMR 信号の三次元フーリエ変換によって、三次元核磁化分布像を再構成する。（図１）

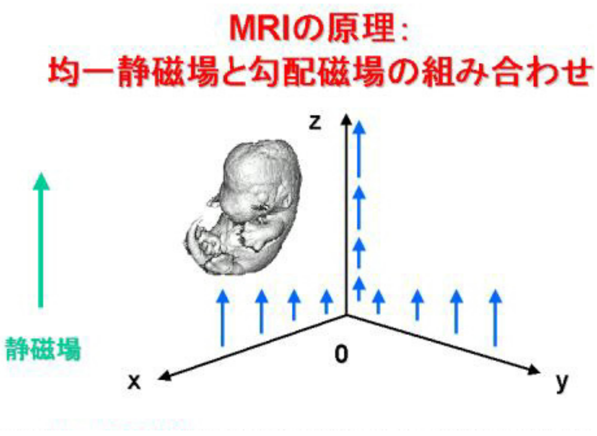


図１

2.3 MR マイクロスコープとは？

MRI と同じ原理で、10～100 ミクロンという高い空間分解能で MR 画像を取得する装置である。プローブの数を増やし（並列）一度に MR 画像を取得できるようにしたものが、並列型 MR マイクロスコープである。またそれ以上にプローブの数を増やしたものを超並列型 MR マイクロスコープという。（写真１）

写真１

[1] E-mail: hoya@bk.tsukuba.ac.jp; 029-853-5496

３．プローブの製作

プローブの製作過程での詳細説明は避け、完成した部品等の紹介に留める。プローブ本体の一個当たりの部品数は約 32 点で構成されており、そのうち既製品はBNC コネクタ、取り付け用のビス等を除いて、ほとんどが工作機械によって加工したものである。

3.1 プローブ部品

写真２、左側は、試験管固定台（銅製）中上は、BNC 固定用台、中下は、接合用アングル、右側は、BNC 固定台（いずれもアルミ合金製）である。

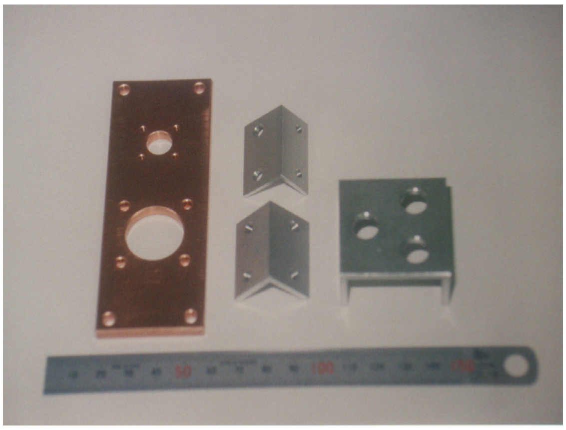


写真２

写真３は、プローブの骨格となる上枠、下枠、横枠（いずれもアルミ合金製）である。

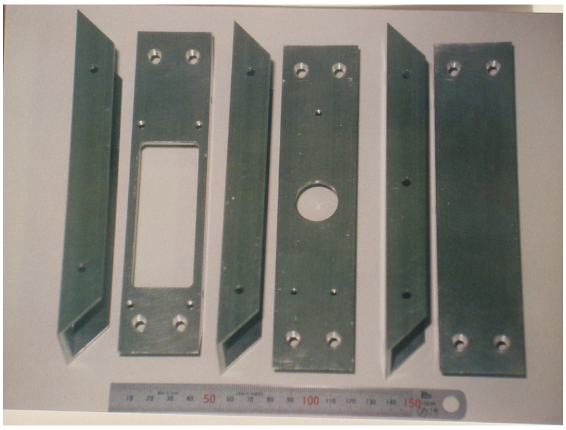


写真３

写真４は、部品を組み立てる前の仮組状態である。

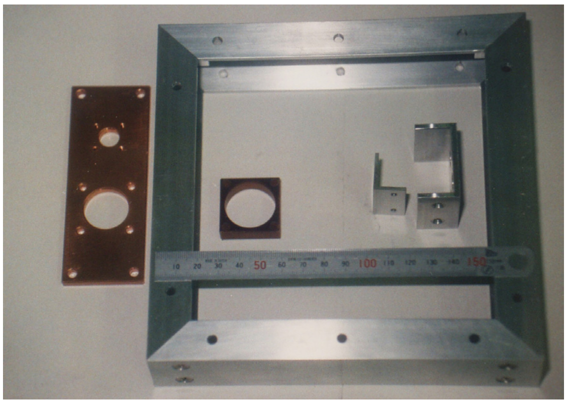


写真４

写真５は、本組「４組（４チャンネル）分」をしたものである。

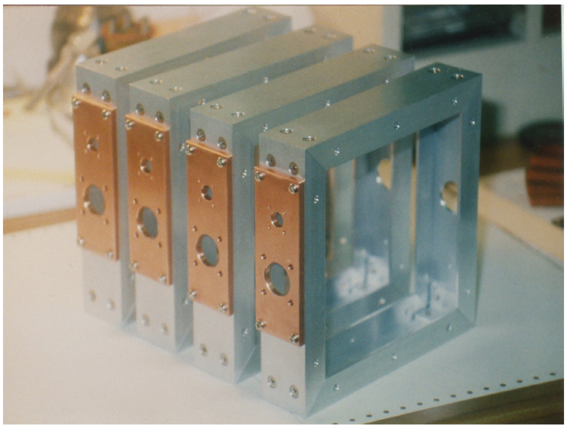


写真５

写真６は、RF コイル等の取り付けも終わった完成写真である。

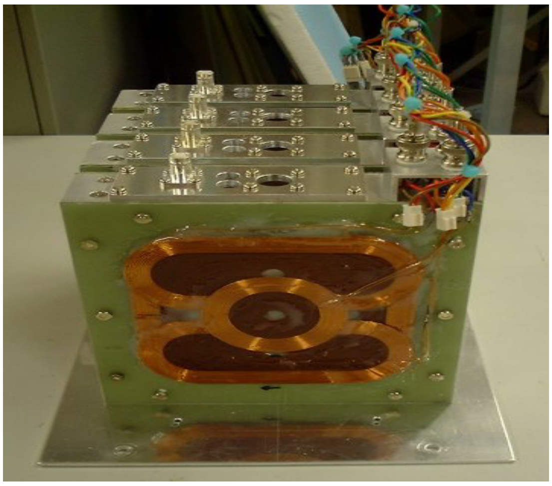
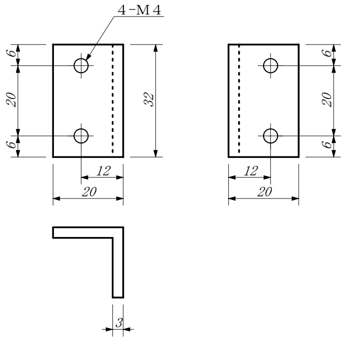


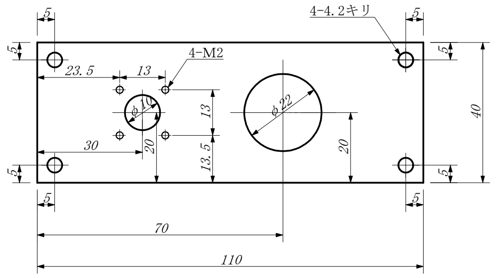
写真６

3.2 プローブ加工図面（一部抜粋）

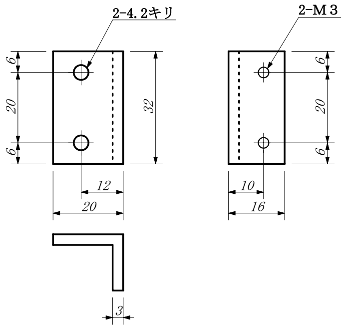
④接合用アングル



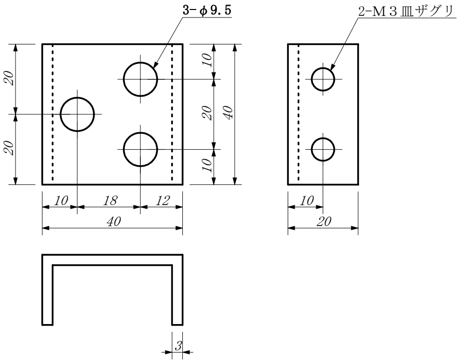
⑤試験管固定用板



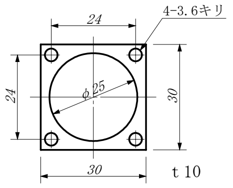
⑥ＢＮＣ固定用台

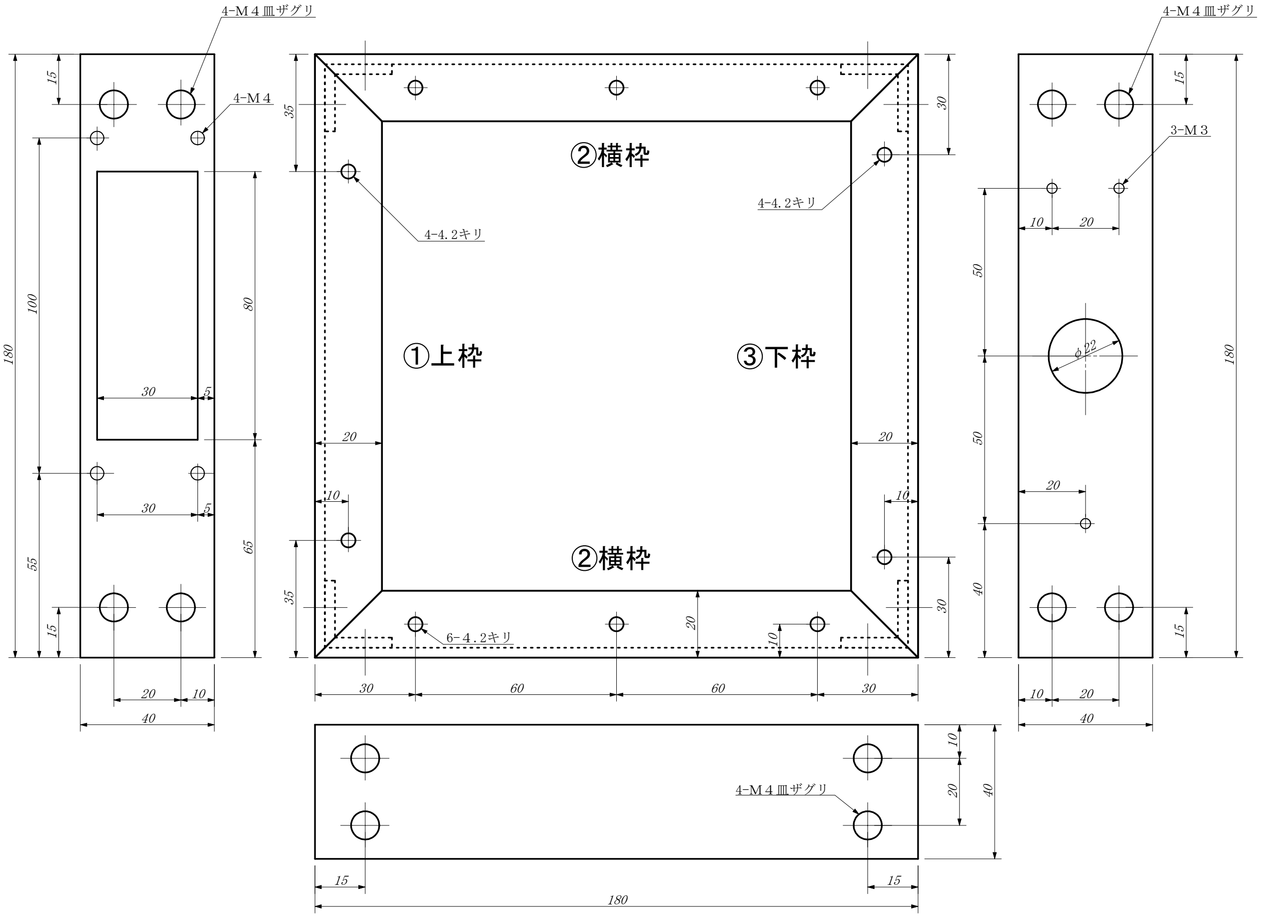


⑦ＢＮＣ固定台



⑧ベーク板





４．京都 4000 プロジェクト

4.1 京都 4000 プロジェクトとは？

京都大学大学院医学研究科附属先天異常標本センターに保存されている、数万体のヒト胚子のうち代表的な数千体を三次元 MR マイクロスコープで撮像し、デジタルデータとして永久に保存するとともに、世界中の研究者に公開しようというプロジェクトです。

4.2 なぜ、このプロジェクトが必要とされるのか？

京都大学に保存されているヒト胚子コレクションは、1960 年代に、京都大学が中心になって組織的に蒐集され、世界的に有名なカーネギーコレクション（数千体）を、質、量ともに遥かに凌ぐ、世界最大のヒト胚子コレクションとなっています。このコレクションは、将来二度と得ることができない大変貴重なものとなっていますので、将来の不測の事態などに備えると共に、ヒトの発生学、遺伝学に寄与するためにも、内部構造も含めた三次元のデジタル化が緊急に望まれているのです。

4.3 なぜ、MR マイクロスコープを使うのか？

MR（磁気共鳴）マイクロスコープでは、サンプルを全く傷つけることなく、三次元の内部構造を描写することができます。よって、得られたデジタルデータを用いて、任意の断層面を観察したり、三次元的な構造を抽出したりすることができます。従来は、サンプルを切断してしまうと、他の面で観察することができませんでした。また、将来、ヒト胚子を別の手法により解析する場合にも、内部構造の基準となるデータを提供することができます。

4.4 プロジェクトの全容は？

第一期 128×128×256 の画素分解能で撮像。
（2002～2004： 現在進行中）
第二期 256×256×512 の画素分解能で撮像。
（2005～2008 ： 予算申請及び計画中）
第三期 512×512×1024 の画素分解能で撮像。
（2009 年以降 ： 要素技術の検討中）

4.5 技術的なむずかしさは？

高い分解能で、MR マイクロスコープ撮像を行うには、数時間以上の時間と撮像のための精密な機器の調節が必要で、そのため、数千個にもおよぶサンプルを撮像するには、大変な時間と労力が必要とされます。撮像時間に関しては、超並列型 MR マイクロスコープという、研究室独自のシステムを開発し、4 倍から 8 倍の効率効果を達成している。
（将来は数十倍の可能性もある。）

京都大学から筑波大学に、貴重なヒト胚子を安全に輸送するのも大きな課題でしたが、保存液に浸した状態で輸送・撮像するプロトコルを確立しました。

4.6 進行状況は？

現在、21 ステージ（約 150 体）と 19 ステージ（約 150 体）の撮像が完了し、20 ステージの撮像が行われています。

4.7 このプロジェクトが与えるインパクトは？

おそらく、このプロジェクトが終わって、データを公開し、世界中の研究者に評価してもらわなければ、本当のインパクトは分からないと思います。しかしながら、ポストゲノム時代を迎え、ヒトの生命科学が、分子生物学、遺伝学、発生学をベースに新たに構築されようとしている現在、このデータベースには、計り知れないものがあると思います。しかも、三次元空間分解能が、100 ミクロン立方（第一期）50 ミクロン立方（第二期）、25 ミクロン立方（第三期）と進むに従って、さまざまなことが明らかになってくると思います。

５．まとめ

我々は、三次元の撮像をするうえで大変重要な部分の一つであるプローブの開発に数年にわたり関わり、プロジェクトの第一期も後半に入り数百体以上の撮像が完了し、プロジェクトは順調に進行している。今後第二期、第三期とプロジェクトは進行して行くが、現段階で、超並列型 MR マイクロスコープの研究開発に寄与できていると考えている。

この報告にあたりご指導頂きました、本学物理工学系　巨瀬勝美教授（NMR イメージング研究室）に深く感謝いたします。

手びきのこぎりのひき曲がり簡易検出方法

田所千明[1]
筑波大学生命・情報等教育研究支援室（農林工学系）
〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

手びきのこぎりによるひき曲りは作業中にどのような手の動きから起こるかを，レーザー光等を用い簡易検出した。その結果，作業者ごとの特徴のある手の動きを捉えることができた。また，未熟練者と中級技能者の力の入れ方の相違が認められた。

１．はじめに

現代はものにあふれ，何一つ自分で作る必要がない。人は物を作ることの楽しみや出来上がった時の充実感を失っている。ハイテク化の現代にあって直接生産に携わる機会が減り，何を作っているのかさえ分らないようになっている。また，ハイテク化が進めば人間性復活としてレジャー・ガーデニング・料理・日曜大工等が盛んになると言われている。人はもともと手を使って道具をつくりものをつくる能力を与えられた動物であった。その道具を扱う腕・手・指を制御する領域は大脳の約半分を占めると言われている。また，ものをつくるには巧緻性が必要とされるが，人はより精度の高い作品を目指す向上心を持っている。つくりもの（既製品）でない自分の感性にあったものがこれからは求められてくる。

平成 11 年にものづくり基盤技術振興基本法（ものづくり基本法）が成立し，その基本理念に，ものづくり基盤技術に関する能力を尊重する社会的気運の醸成を挙げている。木材によるものづくりには，そのような基盤技術が総合的に盛り込まれている。切る，削る，磨く，接合する，穴を開ける，曲げる等基本的な加工技術があり，手工具や小型木工機械などで，ものづくりを実行しやすい。また，非力な子供や女性の力でも加工する事が可能であり，しかも材料の入手も容易である。

生物資源学類の生物材料加工学実習は，中学校技術・家庭科の教員免許取得等を目的とした学生が受講している。本実習では主に手工具による木材の加工を行っている。手工具は作業者のクセが出やすく使いこなすのに時間がかかる。なかでも手びきのこぎりによる作業は未熟練者の苦手としているところである。のこぎりびき作業の基本は，けがき線どおりに真っ直ぐに所定の平面に正しくのこぎりびきができ，しかも正しい姿勢，正しいのこぎりの持ち方と無駄のない力の入れ方ができるようにすることである。この基本を身に付けるには，のこぎりびき作業中の体や手の動きを調べ確認する必要がある。そこで今回，のこぎりびき動作の要である手の動きを表現できるようにしたいと考え，簡単な装置を用いて検出を試みた。

２．実験

始めに，レーザー発光器（周波数 670nm）を水平・垂直方向に微少角度を持たせて埋設し，電源となる電池 2 本が収まるのこぎりの柄を作成した（増加重量 140g）。これに目印（のこぎり先端部）１つを付けた 270mm の替え刃式のこぎり歯を取り付けた。供試材にはロッジポールパイン（厚さ 34mm, 幅 100mm, 長さ 620mm）を用いた。そして供試材長手方向に垂直となるよう，3.6 メートル遠方に鏡の付いたスケールを設置した（図 1 参照）。

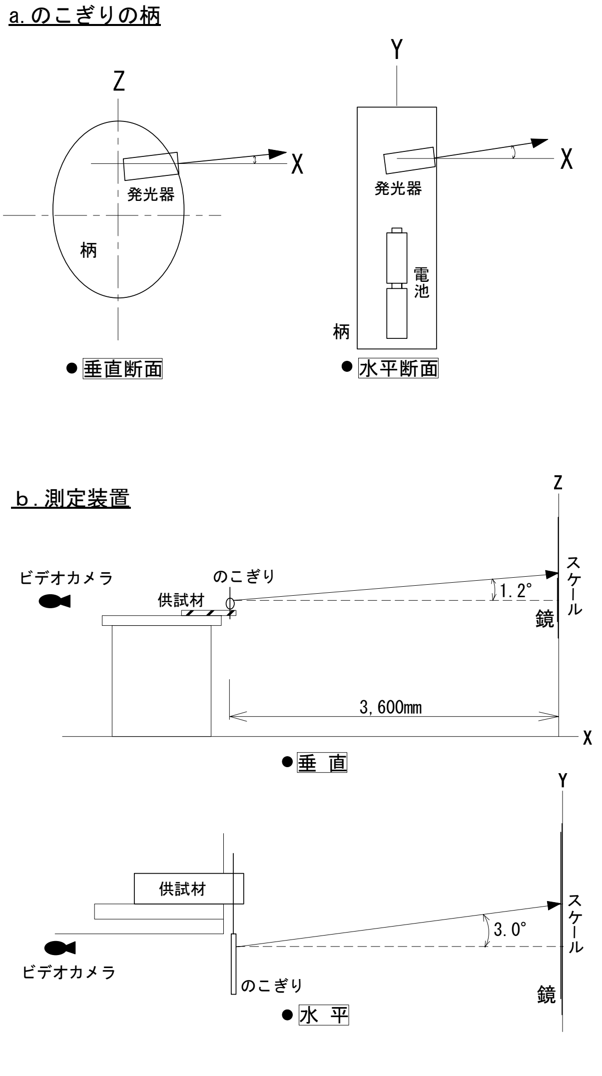


図 1. 実験装置

[1] E-mail: chigira@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

次に，レーザー光を発光させながら上述ののこぎりを用いて，予め上面にけがき線を引いた供試材を50 回片手で垂直に横びきした。のこぎりに埋設したレーザー発光器と目印とした点が鏡面に，また，レーザー発光器より放たれた投光点はスケールおよび鏡面上に，それぞれ映る。発光器，目印および投光点の動きをデジタルビデオカメラで撮影し読み取った。理想的な投光点の位置は，けがき線に平行でかつ，ひき材面に垂直な状態にあるのこぎりより発せられた投光点とした。被験者は未熟練者 2 名と中級技能者 1 名である。

なお，ビデオカメラで撮影された画像は縮小され映るので，撮影された鏡に映る基準の長さを基にスケールの縮尺を求めた。縮尺は約５６％であった。

３．結果

3.1 スケール上の動き

写真１は録画した実験中のビデオキャプチャー画像の一部である。鏡面にのこぎりの目印点とレーザー発光点がスケール上に投光点が映し出されている。

図２は被験者３名ののこぎりびき１往復のスケール上でのレーザー投光点の動きと，その時ののこぎりが理想的な動きをしたと仮定した場合のレーザー投光点の動きを表したものである。

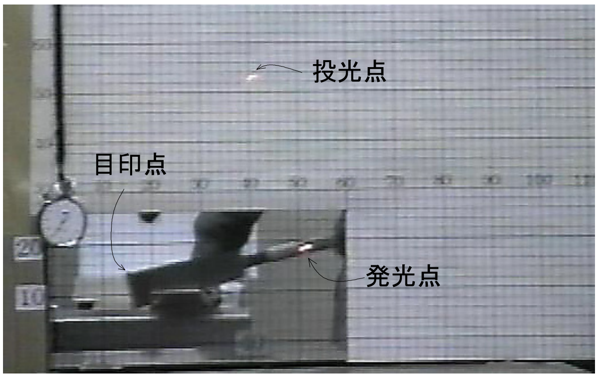
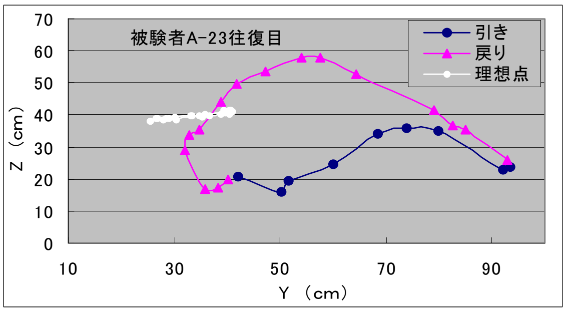


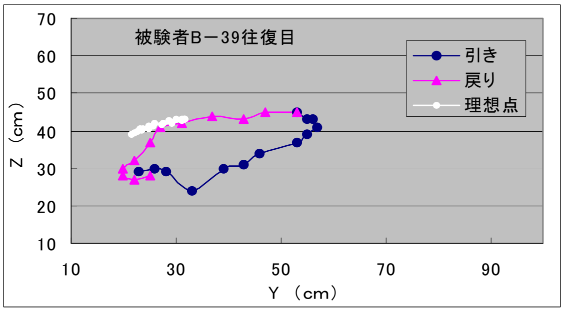
写真 1. ビデオキャプチャー画像例

被験者 A は引き，戻りとも理想点から大きくずれており，被験者 B は A に比べてズレは小さいが肝心の引きの動作のズレが大きい。中級技能者 C は他の２名とは異なり引きの動作が理想点と近い動きになっている。また，理想点の動き（のこぎり１往復のストローク）も大きいことが解る。

図３は理想的なレーザー投光点に対し，のこぎりびきによる投光点がどれだけの角度ズレているのかを示す。投光点のズレについては，けがき線より懐側へひく場合「のこの柄の斜行角」(Φ_1)を（＋）とし，体から離れる側にひく場合（－）とした。また，「のこの柄の傾き角」(Φ_2)は母材側に傾く場合（＋）とし，外側に傾く場合（－）とした。

図４に斜行角および傾き角の求め方を示す。予め実験前にのこぎりをけがき線に平行でかつ，ひき材面に垂直な状態にし，鏡に映ったレーザー発光点と目印点およびスケール上の投光点（理想点）をビデ





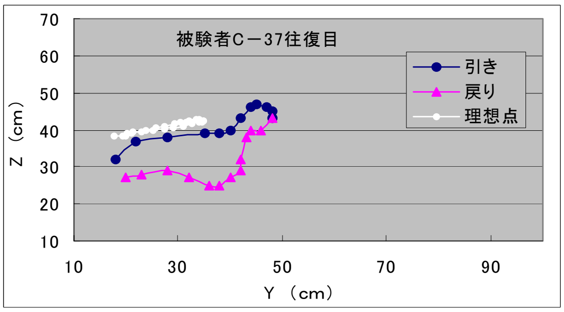


図 2. レーザー投光点と理想点の動き

オカメラに録画し，そのスケール上の座標を読み取り位置関係を求めた（発光点および目印点２点より一意的に投光点（理想点）が決まる）。それにより実際にのこぎりびきをして得たキャプチャー画像の，のこぎりの発光点と目印点を測定すれば理想点を求めることが出来る。縮尺された理想点および投光点座標を元の値に変換して，理想点とのズレを発光点からの Y 軸方向の角（Φ_1）と Z 軸方向の角（Φ_2）としてそれぞれ求めた。

3.2 角度のバラツキについて

被験者の違いによる引き・戻りにおける，斜行角と傾き角の理想点に対する角度のズレのバラツキについは以下のとおりである(図５参照)。

被験者Ａの引き：斜行角Φ_1は殆どが（＋）側で，傾き角Φ_2は（－）側になっていてどちらも値が大きい。（平均値：Φ_1=7.6, Φ_2=－3.4）

被験者Ａの戻り：引きよりもΦ_1, Φ_2 の値が中心に集まっている。（平均値：3.1, －1.1）

被験者Ｂの引き：Φ_1が（＋）側にありΦ_2 には一部で大きな値を示しているが，被験者 A よりもまと

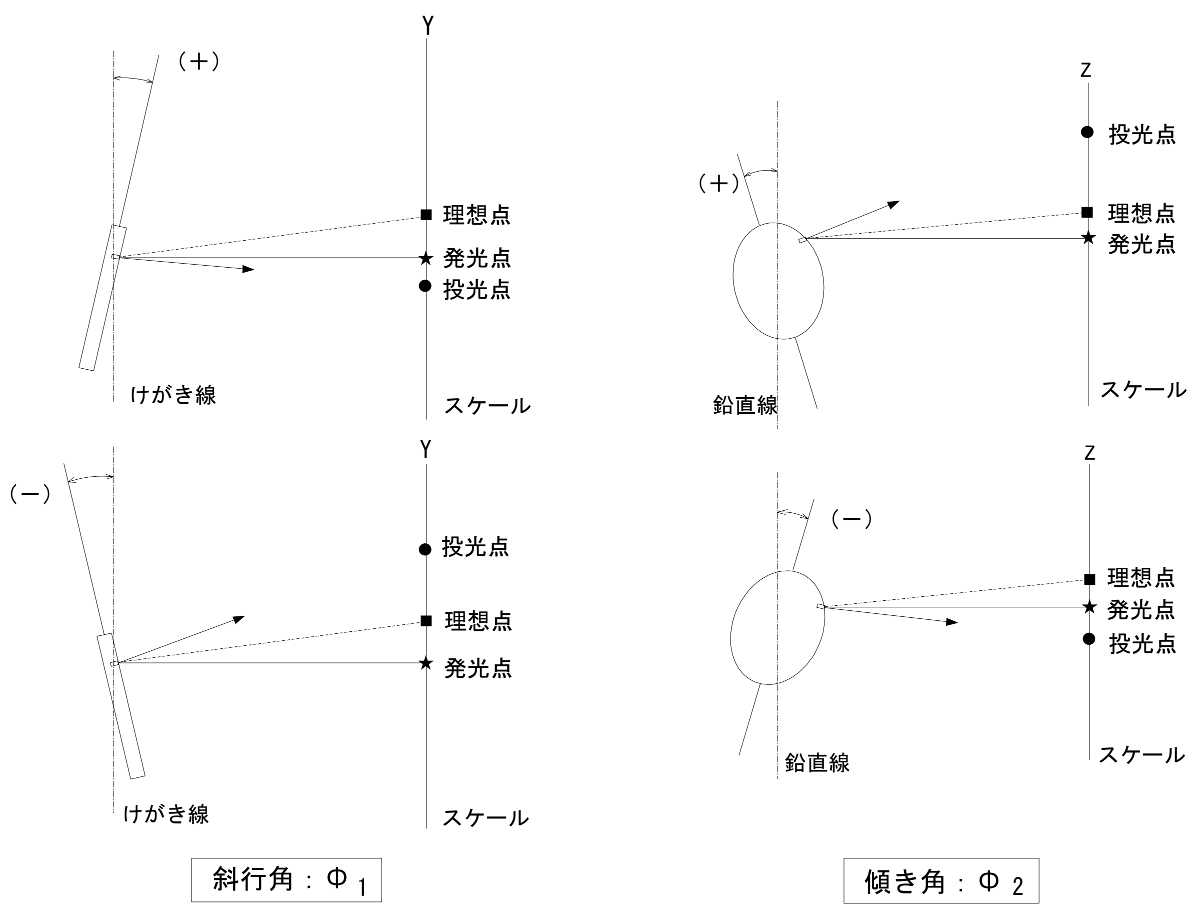


図 3. 斜行角と傾き角

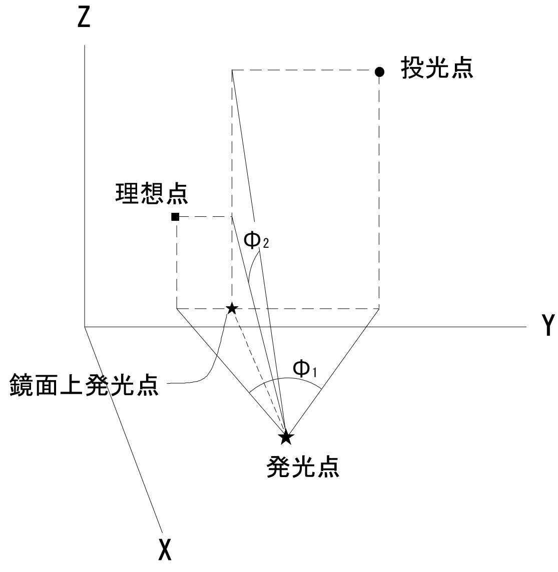


図 4. 計測図

まりがある。(平均値：6.2，－1.7)

被験者Ｂの戻り：引きよりもΦ_1が中心に集まっている。Φ_2は多少中心よりである。(平均値:4.1, -1.1)

被験者Ｃの引き：Φ_1が（＋）側であるが全体のズレは少なくまとまっている。(平均値：2.0，0.4)

被験者Ｃの戻り：Φ_1は引きと同様だがΦ_2が少し（－）側に偏っている。(平均値：2.4，－1.8)

未熟練者ＡおよびＢと中級技能者Ｃの比較では，未熟練者は明らかにΦ_1およびΦ_2のバラツキが大きく値も大きい。特にΦ_1の値が（＋）側で極めて大きいことが分る。これは木材を切る事への意識が働き過ぎている為どうしても力を入れ，自分の体の方へ引きがちになってしまうことによると考えられる。その結果，斜行角Φ_1が（＋）側での大きな値を示すことになる。

3.3 角度変化について

実験中の被験者ごとの引きと戻りの角度変化（斜行角と傾き角）については以下のとおりである(図6参照)。

被験者Ａの引き：実験の開始頃はΦ_1およびΦ_2どちらも極めて大きな値とズレ幅だが，Φ_2はすぐに一定のズレ幅を示しΦ_1は終わり頃に値が小さくなっている。

被験者Ａの戻り：実験の始めはΦ_1，Φ_2とも大きな値とズレ幅だが暫くすると値は小さくなっている。

被験者Ｂの引き：Φ_2が突発的に変化する傾向にあるが被験者Ａよりも小さい値でズレ幅も小さい。

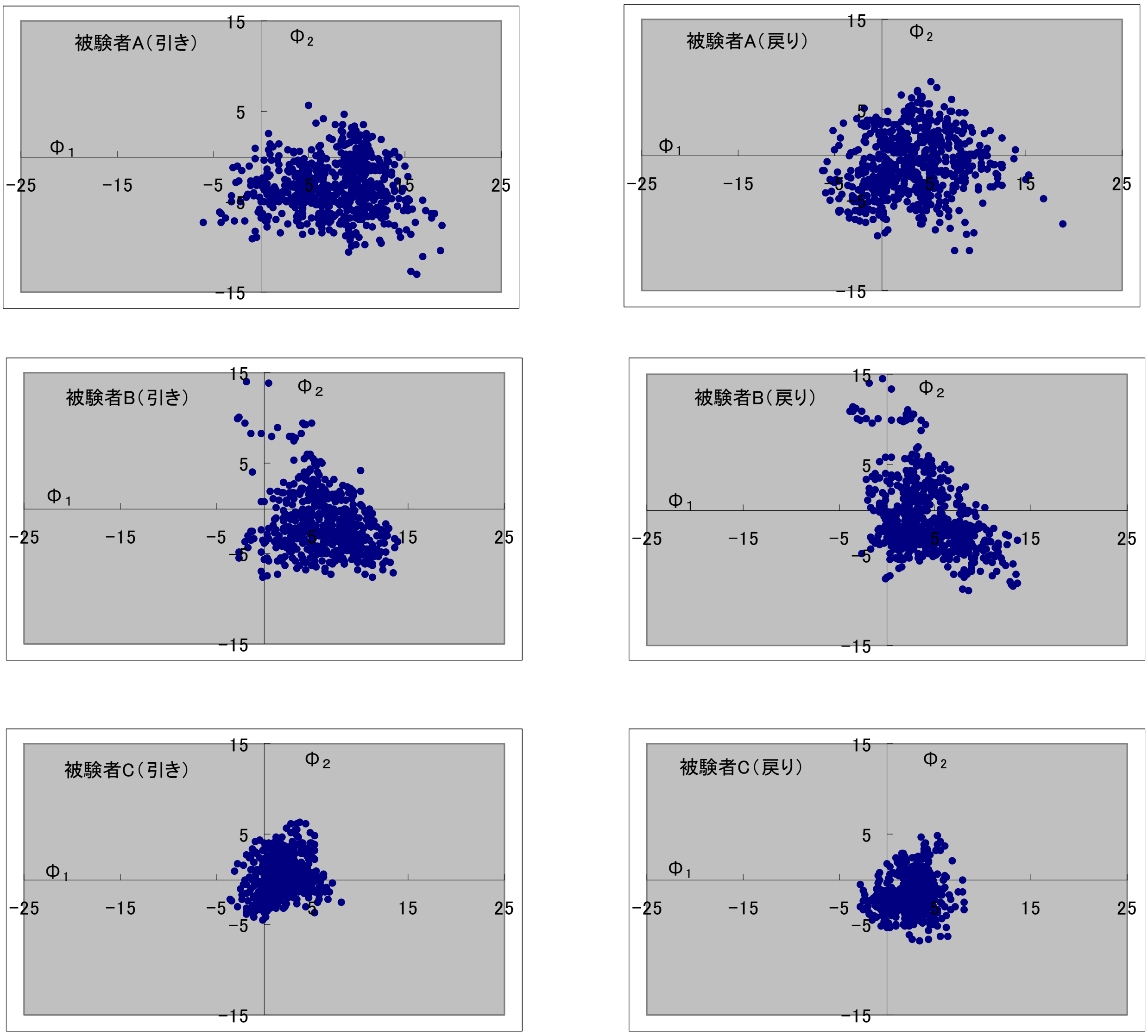


図 5．斜行角と傾き角のバラツキ

被験者Ｂの戻り：引きと同じ時に大きな変化が現れる。

被験者Ｃの引き：Φ_1，Φ_2 の値とズレ幅が小さく一定であるが，他の被験者同様 Φ_1 が（+）側になっている。

被験者Ｃの戻り：Φ_1 は引きと同程度である。Φ_2 は引きよりも（－）側になっている。

未熟練者ＡおよびＢと中級技能者Ｃの比較では，未熟練者は実験の始めに大きなズレが起こっているが，中級技能者は扱いなれているのかズレの幅が小さく一定している。のこぎりびき作業には綺麗な断面を作ることも重要なので，安定した動作が求められる。

3.4 角度変化の詳細について

被験者の違いによる８～１０往復分の斜行角と傾き角の変化の詳細と関係については以下のとおりである。なお，これらの図はのこぎりびき往復５０回中比較的安定した状態と思われる 33～44 回前後のもので，横軸の 800～1000 はキャプチャー画像枚数を表している(図７参照)。

被験者Ａ：Φ_1 は規則的な変化だが Φ_2 は小刻みに変動している。Φ_1 と Φ_2 の関連性については１往復あたり Φ_2 の最大値が Φ_1 の最大値の後に現れている。

被験者Ｂ：１往復あたり Φ_1 および Φ_2 の最大値が同じか Φ_2 が遅れて現れている。

被験者Ｃ：１往復あたり Φ_2 の最大値が Φ_1 がよりも先に現れている。Φ_2 は Φ_1 と比べ規則的に変化している。

未熟練者ＡおよびＢと中級技能者Ｃの比較では，A, Bは Φ_1 がはっきりとした山型をしているがＣは不明瞭な山型である。Φ_2 は３名とも山型であるが C がはっきりとしている。また，１往復あたり C だけが Φ_2 の最大値が Φ_1 の最大値より前に現れている。

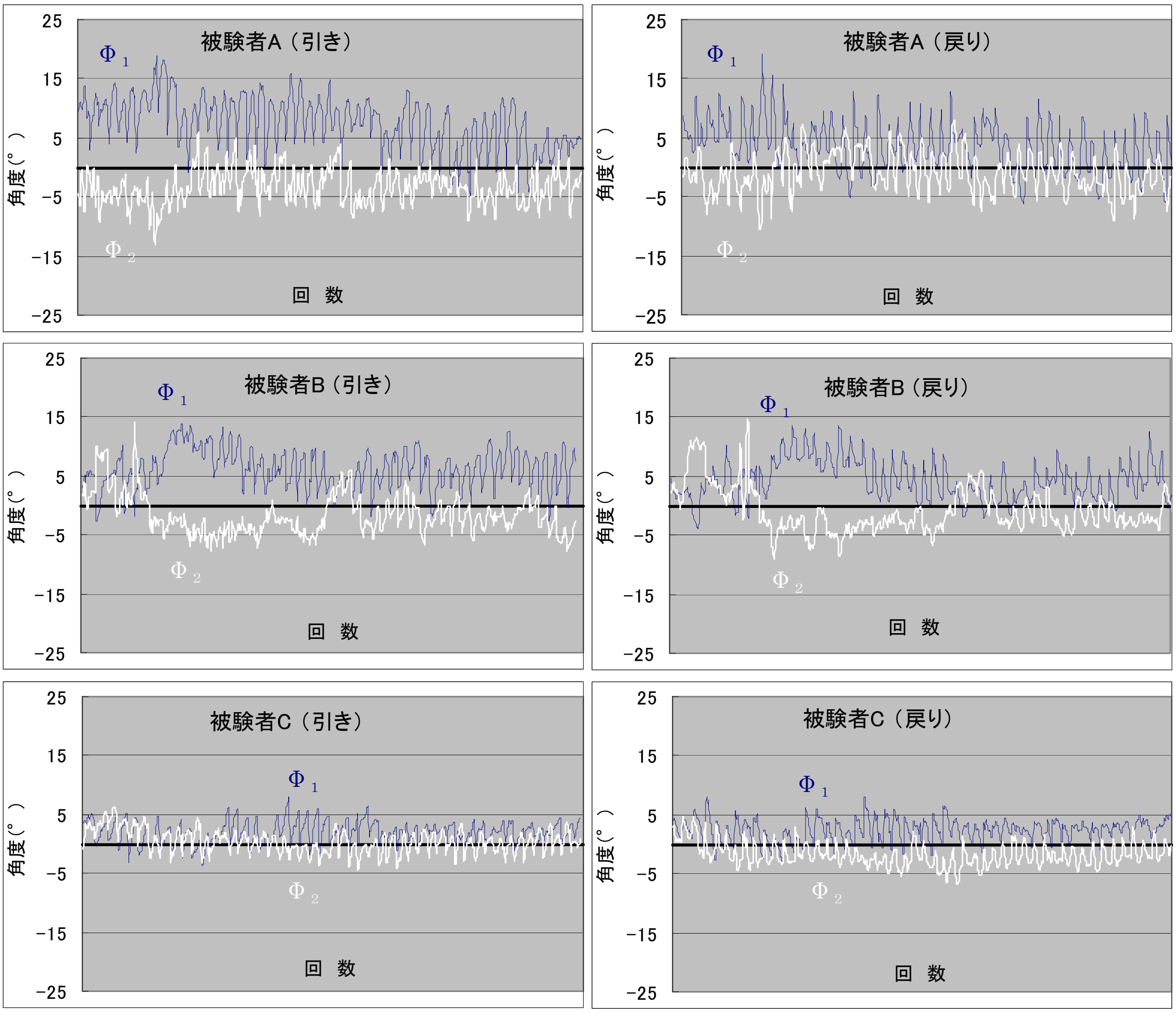


図 6. 斜行角と傾き角の変化

4. 考察

ものを切る動作は①刃物を握り，②対象物を押えつけながら，③引き切る（押切る）ことである。

①の刃物を握る時は，ゴルフではクラブを握るとき小指・薬指・人差指でしっかり握ると力が入りやすいと言われる。その様な力の入れ方でのこぎりを握り，力を入れ引く時にはどうしても手の甲が下を向く。これは傾き角Φ_2が（−）側に向かう事を示している。その結果，Φ_2が減少する時にはしっかり握り，増加のときは力を緩めていることを表していると考えられる。

未熟練者は切り始めからのこぎりを握り締めすぎ，のこぎり本来の刃先の切れを生かしきれていない。のこぎりの歯１枚１枚が確実に対象物を切って行く事が必要だが，力を入れすぎると対象物の上を滑らせてしまい，引っ掛かりの無いのこぎりびきになってしまう。中級技能者の引き始めは力を緩め，確実に供試材を捉えながら引く動作をし，引きの中間当たりで握る力を入れ，戻し終わる前に力を抜くサイクルが出来ていると考えられる。

③の引き切る動作は本来単純な往復運動であるが，人間の癖としてものを引く時には自分の重心を中心に引いてしまう。そこで力を込めてのこぎりを引く時には体の側に持って来てしまう。その結果，Φ_1が減少する時は引くときに現れ，増加の時は戻す動作となって現れると考えられる。

5. まとめ

今回は安価で簡易な装置での実験であったが，被験者ごとの特徴のあるのこぎりびき動作中の手の動きが捉えられた。また，未熟練者と中級技能者の力を入れるタイミングの違いが分り，この力の入れ方がのこぎりびきの精度に影響を与えているのではないかと考えられる。

謝辞

本報告書を作成するにあたりご指導，御助言をいただいた農林工学系栃木紀郎助教授に深く感謝いたします。

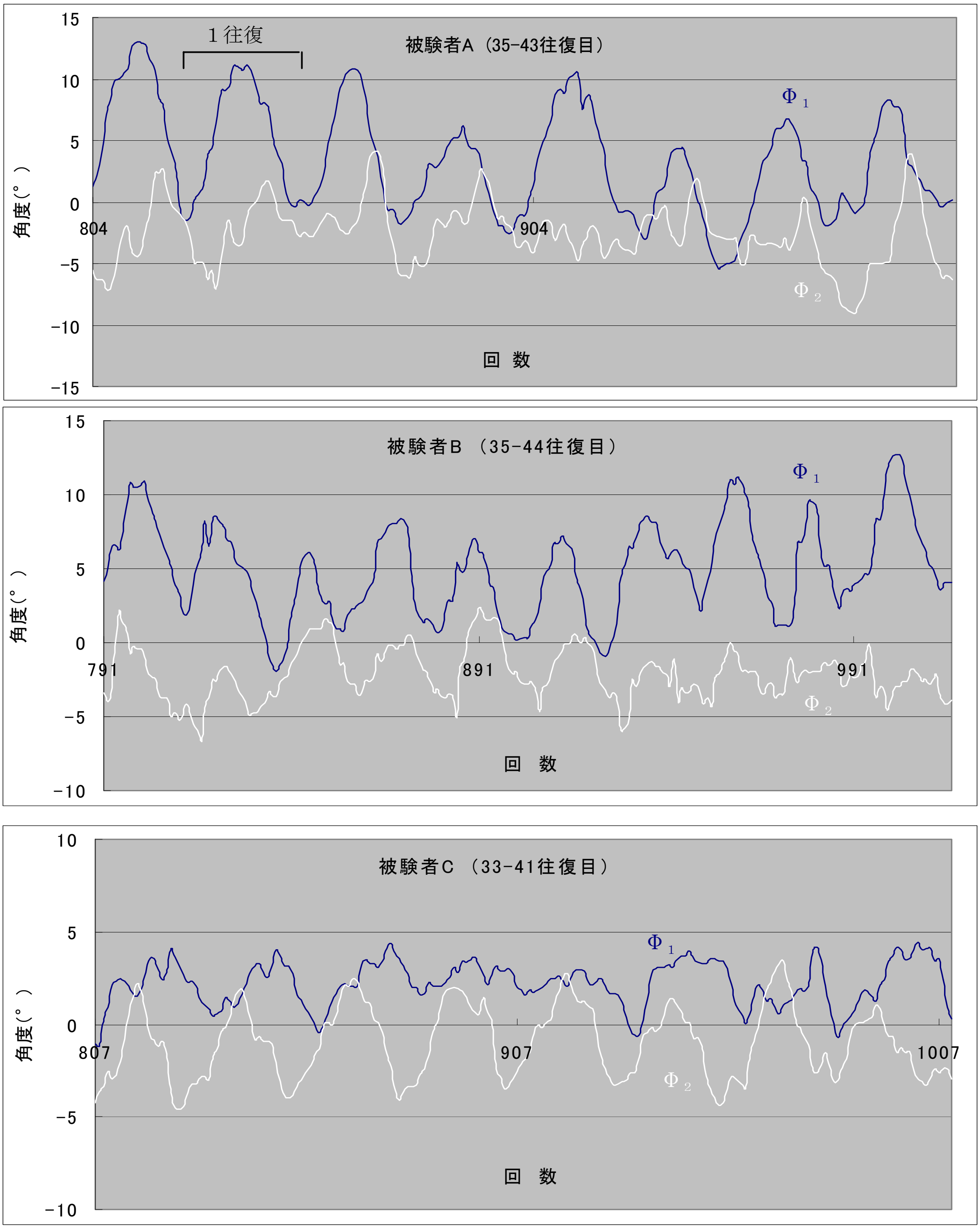


図 7．斜行角と傾き角変化の詳細

ピエゾ素子による位置設定用ユニットの駆動回路製作

○淀縄文男[1]、中原繁男[2]
筑波大学　生命・情報等教育研究支援室（物理工学系）
〒305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

現在、大学などの研究室において実験装置の精密な位置決めなどでピエゾ素子を使用することが多くなっている。このピエゾ素子に電圧を加えることによって伸び縮みすることを利用し位置設定を行なうことができる。この方法を利用した回路の製作が数回にわたり各研究室から製作依頼があった。

今回はピエゾ素子を応用した位置設定用ユニットの駆動回路を製作することになった。このユニットの動作原理は電圧の変化を利用して静的摩擦と動的摩擦を作り、微小の位置変化を作り出すことができる非常にシンプルなものである。

この動作を満足させるためにはランプ波を発生させる回路が必要となってくる。そこで、我々はピエゾ素子を応用したユニットを駆動するドライブ回路（位置決めをするための駆動回路）を、実際に回路設計を行い製作することになった。

１．はじめに

最初に我々が所属している生命・情報等教育研究支援室（物理工学系）についてどのような職場であるか簡単に説明させて頂く。

学系の中には機械、電気、化学の専門分野ごとに３つのグループがあり、それぞれの仕事をしている。そして電気を２名で担当している。

電気担当としての仕事の内容を簡単に述べさせていただく。主な仕事は学系内研究用装置の設計及び製作、LAN の管理（教官用のホームページ、ＩＰアドレス、ＬＡＮの工事など）、電気部品の管理、電気実習（時期：１０月初旬から１１月下旬）、学生に対してアドバイスなどを行っている。また、それぞれに学生実験を担当している。

今回、研究に使用する実験装置の製作の依頼があり、製作したので報告する。

２．回路について

2.1 ブロック図による回路の概略

回路に付いて図１のブロック図を元に説明する。今回の回路の発振部にはセイコーエプソン社のプログラマブル水晶発振器(SPG8640BN)を使用した。これは 57 種類の周波数(1/120Hz-1MHz)を簡単にディップスイッチにより CTL1～CTL6 を選択することによって周波数を出力できるものである[1] 。ここで選択された周波数を次の D-A 変換部に入力する。

D-A 変換部はバイナリカウンタ 74HC4040 と 8 ビットのバイポーラの D-A コンバータ DAC0800 そして電流電圧変換用の OP アンプによる３個の IC によって構成している。この回路構成によって電圧波形（ランプ波）を作り出力している。また、ここで作られた出力波形を電圧増幅回路に入力し約１倍から２倍の可変出力波形としている。

IC(LF356)は FET 入力の扱いやすい OP アンプで一般的に広く使われている。

次に電圧増幅で作られた可変の電圧を整流回路に入力し正の波形と負の波形を取り出している。これは OP アンプとダイオードの組み合わせによる理想ダイオード回路としダイオードの順方向電圧のロスをなくしている。ここで使用しているダイオードは 1S1588 で、一般的に出回っているシリコン・ダイオードである。

この正側用ダイオード、負側用ダイオードによって出力された正電圧波形は位相反転回路を通した後に位相切り替えスイッチに、負電圧波形は直接位相切り替えスイッチに、それぞれの負の波形を選択し出力モニター用 OP アンプとアナログスイッチに送られる。

使用したアナログスイッチ(LF13333)はロジック入力でアナログ信号を ON、OFF できる。

出力モニターの回路には、やはり LF356 を負入力とし波形がパルス状なのでメータのふらつきを無くすために積分し直流メータにより直読できるようにした。

D-A 変換部のバイナリカウンタから送られた信号はロジック回路を通しカウンター部の 74HC190 をシリーズ接続して２桁までセットできるようにした。

カウンター回路部は、74HC123 のワンショット・マルチバイブレータを使いスタートパルスを作り R-S フリップ・フロップを通し 74HC107 の J-K フリップ・フロップからロード信号を 74HC190 の UP/DOUN デコーダ･カウンタに送っている。これは、立下りのスタート信号を L トリガ形 R-S フリップ・フロップで H にセットし、74HC4040 の 12 ビットカウンタからの信号をカウンター回路部の基準パルスとし D タイプフリップ･フロップに送り 1/2 分周回路を通して J-K フリップ･フロップのクロックと 74HC190 のデコーダ・カウンタのクロックに送っている[2] [3] [4]。

ここでの J-K フリップ・フロップはスタート信号を基準パルスに同期させるためである。また、カウンター内のセットした値が“0”になると、基準パルスの立下りに同期し、RCO(Ripple Carry Output)出力が“L”となり、R-S フリップ・フロップがリセット

[1] E-mail: yodonawa@bk.tsukuba.ac.jp
[2] E-mail: nakahara@bk.tsukuba.ac.jp

される。デコーダ・カウンタにプリセットすべきデータを与えるために使用したデジスイッチは、オムロンのサムロータリースイッチである[5]。

このカウンター回路において設定された数だけ高圧増幅回路（高圧のためOPアンプと耐圧の大きいトランジスタのデスクリートで組んだ。）に送り増幅し出力される。この増幅回路は入力電圧を10倍に増幅する。

回路に使用した高圧電源はあまり電流が必要としないため電流制御方式は使わず電源は倍電圧整流回路のみとした。以上が回路の大まかな説明である。

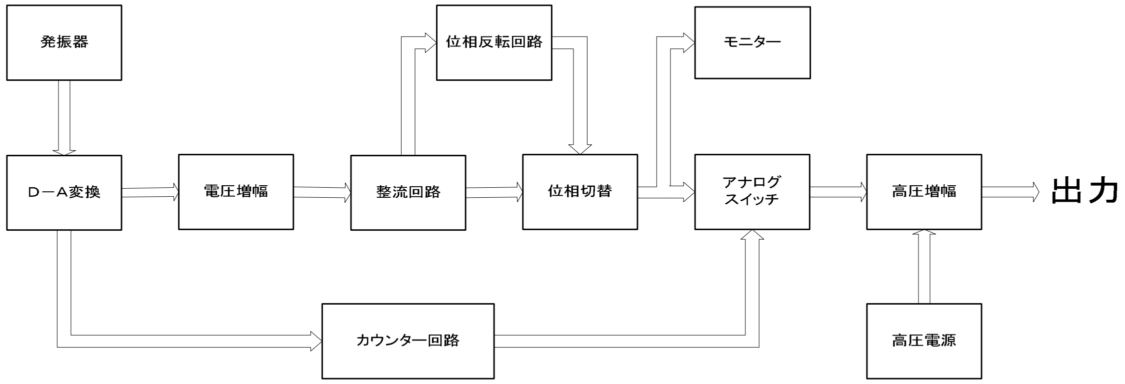


図１．ブロック図

2.2 プリント基板の製作

プリント基板の製作についてはいろいろな方法がある。パーソナルコンピュータが発達している現代ではプリント基板の製作に当たって自動化が我々にも身近になりつつある。

その一つの方法として、すべてコンピュータによってパターン図を描きその描いたものを専用のプリント基板製作機械で削り取ってしまうという非情に簡単で、しかも早く製作することが出来る。このような機械を購入すれば楽であるが使用頻度を考えるとコストが高くなり、無駄のように感じられる。また、簡単に製作しやすい方法としてフォトエッチング法がある。沢山の基板を焼くのであればフォトエッチング法も良いが、我々が関係している研究室の仕事である装置製作は単品ものが多いことから今回の製作にあたってはすべて手書きで製作した。

アナログ回路とデジタル回路があるため配線の引き回しとノイズを考慮して両面基板を使用した。製作の方法としてはトレーシングペーパーにパターン図を描きそれをプリント基板に写し取る方法で少し原始的でもある。今回使用したものはガラスエポキシ系の厚さ1.6tの両面基板を使用した。

この様な方法で出来上がったものが写真１のプリント基板である。写真２はプリント基板に部品を実装したものである。

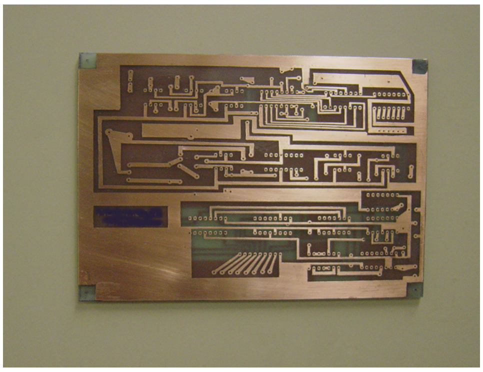


写真１．プリント基板

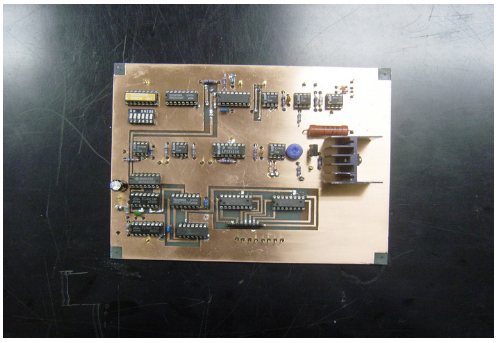


写真２．部品実装

３．完成した装置

電源部、メインボード、その他の部品をケースに収め配線し完成したユニットである。

写真３は製作した本体の写真であり、出力を見やすくするためにモニター用のアナログメータを正面パネル中央に配置し出力可変用ボリュームをその下に取り付けた。右側のツマミは方向設定用、デジタルの表示はパルス数を設定し、下のスタートボタンにより　設定数のパルスを出力する。

写真４はユニット内部の写真で左側がメインボードで右上が電源部、右下が電圧変換用トランスである。

写真３．正面パネル

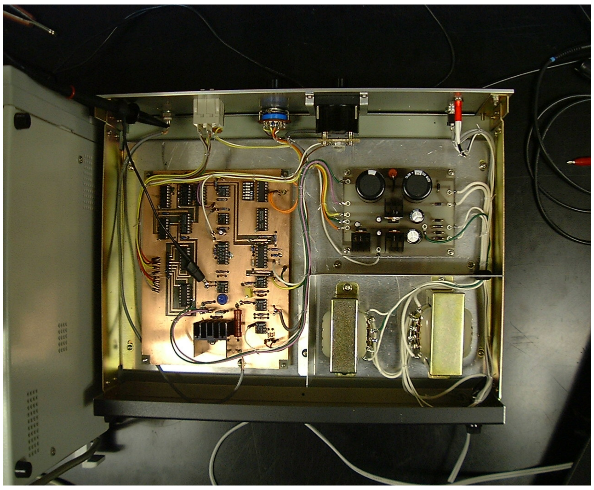


写真４．ユニット内部

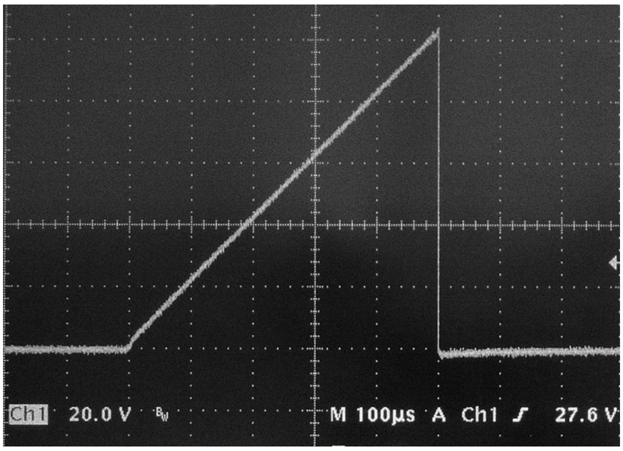
４．波形観測

4.1 正方向波形

写真５は出力電圧：100V、パルス幅：500μs のランプ波を単発セットし出力した波形である。

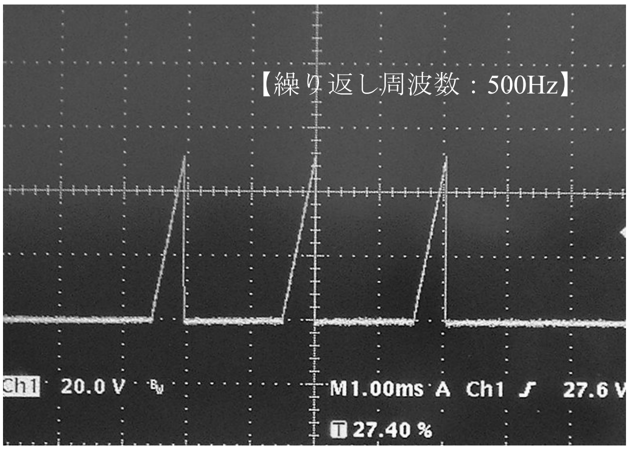
写真６は出力電圧：50V、パルス幅：500μs のランプ波を３発セットし出力した波形である。

写真７の上側は正方向電圧波形（出力電圧：100V を３発出力にセットし出力させた波形）であり、下側はその波形の立下りの波形を測定した。出力電圧：100V 立下り：2μs である。



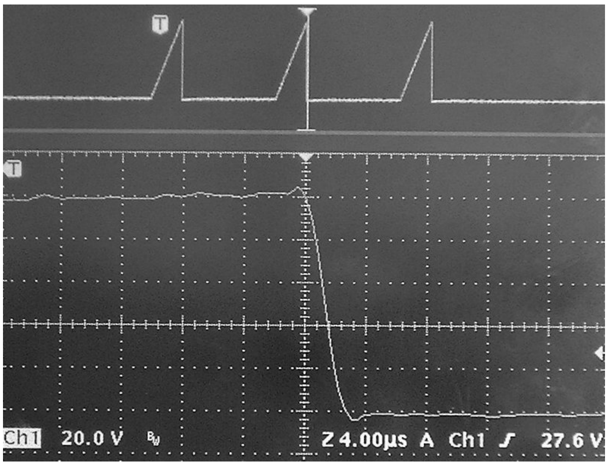
X 軸：100μs/div　Y 軸：20V/div

写真５．正出力波形



X 軸：1ms/div　Y 軸：20V/div

写真６．正出力波形（３発）

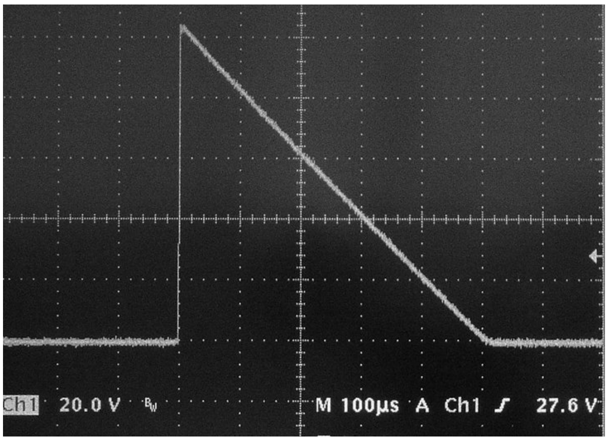


X 軸：4µs/div　Y 軸：20V/div

写真７．正出力波形（立下り）

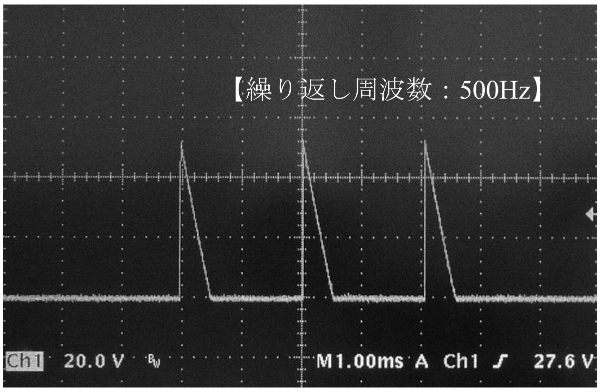
4.2 逆方向波形

写真８は出力電圧：100V、パルス幅：500µs のランプ波を単発セットし出力した波形である。
写真９は出力電圧：50V、パルス幅：500µs のランプ波を３発セットし出力した波形である。
写真１０上側は逆方向電圧波形（出力電圧：３発出力にセットし出力させた波形）であり、下側はその波形の立ち上がりの波形を測定した。出力電圧：100V 立ち上がり：2µs である。



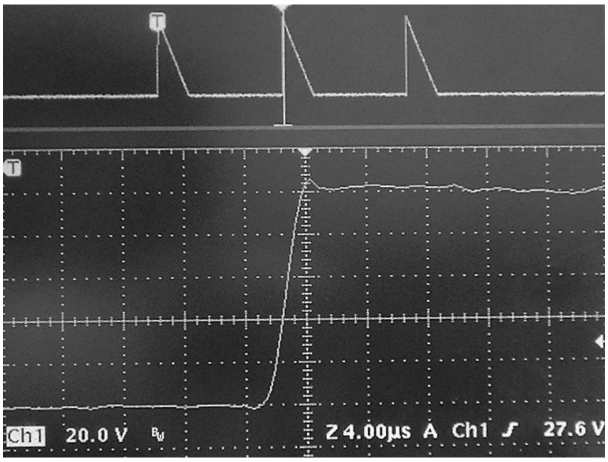
X 軸：100µs/div　Y 軸：20V/div

写真８．逆出力波形



X 軸：1ms/div　Y 軸：20V/div

写真９．逆出力波形（３発）



X 軸：4µs/div　Y 軸：20V/div

写真１０．逆出力波形（立上り）

５．測定結果

今回製作した駆動回路については仕様書にそって製作したユニットの出力波形をそれぞれ測定してみた。ランプ波の立ち上がり、及び立ち下がりを測定したが仕様書の指定では正方向波形では立ち上がり：150µs 以上が 500µs であり、立下り：15µs 以下の指定が 2µs であった。また逆方向波形では立ち上がり：15µs 以下を 2µs となり立下り：150µs 以上が 500µs とした。
仕様書においては、繰り返し周波数：2KHz 以下とするとの事で繰り返し周波数は 500Hz と設定した。パルスのセットは９９パルスセットできるようになっている。そして出力電圧は指定どおり 50V から最

大 120V まで連続で出力可変可能にし、測定した結果スムーズに波形も歪まず出力されたことが分かった。ストック部品を使うことを目標に製作したが、仕様書は十分満足することができた。

６．今後の課題

ストック部品での製作では限界がある。今後は、段数の多いバイナリカウンタやそれに対応した D-A コンバータを購入し分解能を良くした場合どの位精度が良くなるか製作し、比較してみる。また、実際に研究に試用した結果を報告していただきそれを基に改良を重ねていき完成度の高い装置にすることが課題であると同時に今後の装置作りの基礎にすることを我々は考えている。

謝辞

今回の製作にあたって協力して下さった物理工学系牧村哲也講師に深く感謝いたします。

参考文献

[1]　セイコーエプソン（QUARTZ　DEVICE）pp47-48
[2]　トランジスタ技術 SPECIAL№. 4　p100
[3]　高速 CMOS ロジック・データブック（日本テキサス・インスツルメンツ 1991）
[4]　中原繁男、淀縄文男：分光計測用 24 ビット・カウンターの製作, 筑波大学技術報告№13（1993）　pp13-20
[5]　OMRON ベスト制御機器オムロン第 12 版　pp883-892

全ゲノム連鎖解析法による疾患感受性遺伝子座の検索

伊藤清子[1]、有波忠雄[2]
[1]筑波大学人間総合等教育研究支援室（医学系）、[2]筑波大学基礎医学系
〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

全ゲノム連鎖解析法は、多因子疾患の原因遺伝子座や感受性遺伝子座を全染色体上にくまなく検索する方法である。多因子疾患は、複数の遺伝因子と環境因子の影響により発症する。多因子疾患である小児気管支喘息の感受性遺伝子座の検索を目的として、染色体全域に存在するマイクロサテライト (MS) マーカーを約 10 cM 間隔で選択し、疾患との連鎖の有無を調べた。連鎖の統計解析には、ノンパラメトリック法の一つである罹患同胞対法を用いた。その結果、第 4 染色体 (4q35)、第 5 染色体 (5q31-33)、第 6 染色体 (6p22-21.3)、第 12 染色体 (12q14-24.2) と第 13 染色体 (13q14-14.3) のそれぞれの領域に小児気管支喘息との連鎖が見られ、この領域が感受性遺伝子座である可能性が示唆された[1]。

１．はじめに

近年、多くの疾患感受性遺伝子が、分子遺伝学的手法の発達とヒトゲノムプロジェクトの進行により明らかになってきている。

疾患感受性遺伝子を同定する主な研究方法には、連鎖解析法と候補遺伝子解析法がある。連鎖解析法は、その疾患を発症している構成員を含む家系を対象として、発症に強い影響を与える遺伝子座を染色体上に見い出すことを目的としている。候補遺伝子解析法は、その遺伝子上に存在する多型と疾患との相関を明らかにすることを目的としている。

今回報告する全ゲノム連鎖解析法は、疾患との連鎖の有無を染色体全域にわたって検討する方法であり、疾患感受性遺伝子を同定するための検索法として広く用いられている。

２．目的

全ゲノム連鎖解析法を用いて、染色体全域にわたって小児気管支喘息感受性遺伝子座を検索する。

３． 方法

3.1 対象

日本人の小児気管支喘息を有する 2 人以上の子ども（同胞）がいる家系を対象とした。対象数は 47 家系 197 人で、罹患同胞は 65 対である。本研究は、筑波大学倫理委員会で承認された方法で、本人および親よりインフォームドコンセントを得て行った。

3.2 遺伝子解析

3.2.1 DNA の抽出

EDTA 加採血を行った静脈血 10 ml を 2,000 rpm で 10 分遠心後、血漿成分と血球成分に分離し、Kunkel らの方法[2] に従い、この血球成分から高分子の DNA を抽出した。遠心分離して得られた血球成分を 9 倍量の抽出液 (0.32 M sucrose、5 mM $MgCl_2$ 、1% TritonX-100、10mM Tris-HCL、pH7.6) にて希釈後、3,000 rpm で 15 分遠心して核分画を得た。この核分画を 3 ml の proteinase K 用緩衝液 (10 mM Tris-HCL、10 mM EDTA、10 mM NaCl、pH 8.0) に浮遊させた後、最終濃度 0.5 % になるように SDS を加えて核膜を破壊した。次に、0.6 mg の proteinase K を加え、37 °C で一晩反応させてタンパク質成分を分解した。さらに Phenol 処理による除タンパク後、透析液（10 mM Tris-HCL、1 mM EDTA、pH 8.0）に透析し Phenol を完全に除いた。次に、RNase を最終濃度 100 µg/ml になるように加え、37 °C で 1 時間反応させて RNA を分解した。さらに proteinase K 反応、Phenol 処理、透析を繰り返した。

抽出した DNA は分光光度計で測定し、$1OD_{260}$=0.055 mg/ml として DNA 濃度を計算し、最終濃度 10 ng/ml になるように TE (10mM Tris-HCL、1 mM EDTA、pH 8.0) で調整し、4°C で保存した。

3.2.2 遺伝マーカーの選択

全ゲノム連鎖解析法は、遺伝マーカーとして全染色体上に存在する一塩基置換多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) 、あるいは単純な繰り返し配列であるマイクロサテライト (MS) を用いて行われる。今回、我々は MS マーカーを用いた。MS マーカーは 1 から 4 塩基程度の配列単位で反復しているもので、反復数が個体間で異なることが多く、しかも反復数がさまざまで対立遺伝子が多いため遺伝子マーカーとしては有用なものである（図 1）。

染色体全域に存在する MS マーカーを全染色体上でほぼ均等 (約 10cM) になるように選択し、それら MS マーカーすべてについてサイズが 100 ~ 400 bp になるように PCR プライマー を作成した。さらに PCR プライマー の上流側の 5’ 末端に蛍光色素の FAM（青）、HEX（緑）または TET（黄）を標識し、

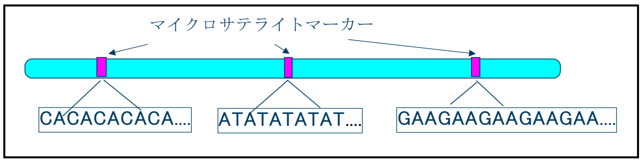


図 1 染色体上に点在する MS マーカー

E-mail: s-itoh@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3352

それぞれの MS マーカーを区別できるようにした。本研究では、リサーチジェネテイクス社のヒューマンリンケージマッピングスクリーニングセット ver.8 を用い、全染色体で 386 ヶ所の MS マーカーを検討した。内訳は、第 1 染色体 30 ヶ所、第 2 染色体 28 ヶ所、第 3 染色体 25 ヶ所、第 4 染色体 21 ヶ所、第 5 染色体 23 ヶ所、第 6 染色体 19 ヶ所、第 7 染色体 20 ヶ所、第 8 染色体 19 ヶ所、第 9 染色体 16 ヶ所、第 10 染色体 20 ヶ所、第 11 染色体 15 ヶ所、第 12 染色体 18 ヶ所、第 13 染色体 11 ヶ所、第 14 染色体 14 ヶ所、第 15 染色体 12 ヶ所、第 16 染色体 14 ヶ所、第 17 染色体 15 ヶ所、第 18 染色体 14 ヶ所、第 19 染色体 10 ヶ所、第 20 染色体 10 ヶ所、第 21 染色体 6 ヶ所、第 22 染色体 6 ヶ所、性 (X,Y) 染色体 21 ヶ所である。

3.2.3 PCR 反応 (Polymerase Chain Reaction)

上記の PCR プライマーを患者の DNA 増幅に用いた。DNA と PCR プライマーを含む反応液 10 µl を下記のように 96 穴 PCR プレート上に調整し、DNA 増幅器 (Gene Amp PCR System 9600、Applied Biosystems [ABI]) にて増幅させた。

反応組成液

10xBuffer (ABI)	1.0 µl
10mM dNTP mix	0.8 µl
25 mM $MgCl_2$	0.8 µl
Forward Primer	0.3 µl
Reverse Primer	0.3 µl
Taq polymerase (ABI)	0.04 µl
Template DNA	0.8 µl
滅菌蒸留水	5.96 µl

PCR 反応は、95°C で 5 分間の鋳型 (Template) DNA の変性後、94°C で 15 秒、55°C で 15 秒、72°C で 30 秒の変性、アニーリング、伸長を 10 回繰り返し、さらに 91°C で 15 秒、55°C で 15 秒、72°C で 30 秒の変性、アニーリング、伸長を 25 回繰り返し、最後に 72°C 10 分間の DNA 伸長を行った。

3.2.4 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

MS マーカーそれぞれについて増幅させた患者の DNA (PCR 産物)を熱変性後、ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、遺伝子型を決定した。電気泳動には DNA シークエンサー (ABI PRISM™ 377) を

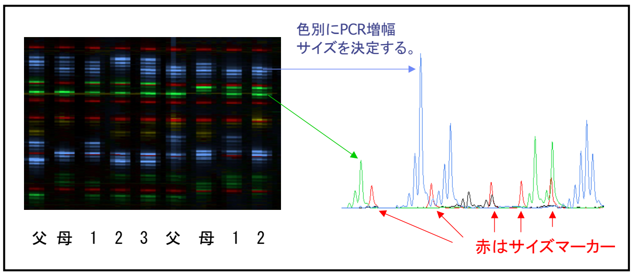


図 2 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動による MS マーカー遺伝子型決定の原理

用いた。ゲル板は、36 cm のガラス板に 4% アクリルアミドゲル溶液 30 ml (尿素 10.8 g、5xTBE [0.5M Tris-boric acid、10 mM EDTA] 6 ml、40% アクリルアミド液 [38% acrylamide、2% methylene bis-acrylamide] 3 ml、10% 過硫酸アンモニウム 150 µl、TEMED 15 µl) を流し込んで作製した。コームは 36 well コームを使用した。蛍光 (FAM、TET、HEX) とサイズ (bp) が重ならないように遺伝マーカーを選んで、1 つのレーンに 8~9 種の PCR 産物を同時に泳動できるようにした。FAM、TET で標識された PCR 産物は 10 分の 1 に、HEX で標識された PCR 産物は 5 分の 1 になるように希釈混合し、混合液 1 µl にホルムアミド 1.5 µl、Blue Dextran (50 mM EDTA、50 mg/ml Blue Dextran) 0.3 µl、サイズスタンダードの GS-500 TAMURA (ABI) 0.3 µl を加え、95°C で 5 分間の熱変性を行った後、急冷し 1 本鎖 DNA にした。この 1 本鎖 DNA をサンプルとして 1 レーンあたり 2.5 µl ずつ泳動した。この 1 本鎖 DNA が、そのサイズ（bp）によりゲル上に分離され、MS マーカーの繰り返し配列の数によって 2~4 bp の倍数の差で検出された（図 2）。

3.2.5 遺伝子型の判定

サンプルの 1 本鎖 DNA と同時に泳動したサイズスタンダード GS-500 TAMURA を基準として、目的の MS マーカーのサイズを相対的に求めた(図 2)。GENESCAN™ software (ABI) と GENOTYPER software (ABI) の両方で波形を見ながら、親子間のサイズを確認し、各 MS マーカーの遺伝子型を決定した(図 3)。

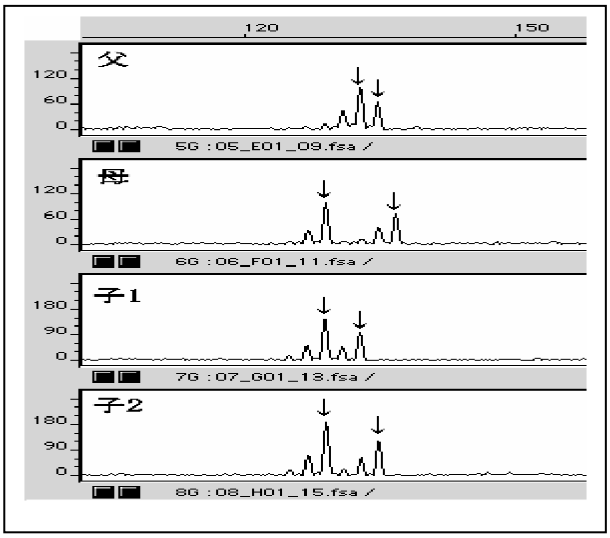


図 3 親子間の MS マーカーの遺伝子型

3.3 統計解析

3.3.1 連鎖解析法

家系を用いた連鎖解析には、パラメトリック法解析とノンパラメトリック法解析がある。ノンパラメトリック法解析は、遺伝形式を規定しないで解析することができるため、多くの遺伝子と環境が複雑にからみあって発症する多因子疾患の感受性遺伝子の同定に広く用いられている。

今回、我々が対象とした小児気管支喘息は多因子疾患であるので、ノンパラメトリック法にて解析した。しかも、ともに患者である同胞とその両親からなる家系を対象としているので、ノンパラメトリック法解析の一種である罹患同胞対解析を行った。

罹患同胞対解析では、患者である子ども達すべてが必ずしも疾患の原因となる感受性遺伝子を持っているとは限らないが、同胞がともに親から感受性遺伝子を受け継いでいる可能性が高く、そのため疾患と連鎖している領域では、対立遺伝子を偶然より高い確率で共有していることが期待される。故に、疾患と MS マーカーの連鎖の有無を解析することによって、疾患感受性遺伝子座を検索できる。実際には、小児気管支喘息と MS マーカーとの連鎖を、同胞間で観察された共有する同祖遺伝子 (alleles identical by descent、IBD) の割合から、多点ノンパラメトリックスコアである MLS (multipoint maximum lod score) を求めた。解析にはコンピュータープログラム MAPMAKER/SIBS ver2[3] を用いた。

3.3.2　連鎖の可能性を示す基準

本研究では、E.Lander らの提唱した多因子疾患の全ゲノム検索の判定基準[3] に従い、Lod (logarithym of odds) 値 3.6 以上を有意な連鎖、Lod 値 2.0 以上を有意な連鎖を示唆する基準とした。なお、Lod 値は、2 つの遺伝子座が連鎖している可能性としてない可能性の比であるオッズ (odds) 比の対数値で表される。Lod 値 3.0 は、連鎖している可能性がしてないものより 1000 倍高いことを意味する。

４．結果と考察

全ゲノム連鎖解析法により、小児気管支喘息の感受性遺伝子座を染色体全域にわたり検索した結果を図 4-1、4-2 に示した。疾患との連鎖の可能性を示す領域は、第 4 染色体 (4q35、 lod 2.74)、第 5 染色体 (5q31-33、lod 4.52)、第 6 染色体 (6p22-21.3、Lod 2.13)、第 12 染色体 (12q14-24.2、Lod 2.0) と第 13 染色体

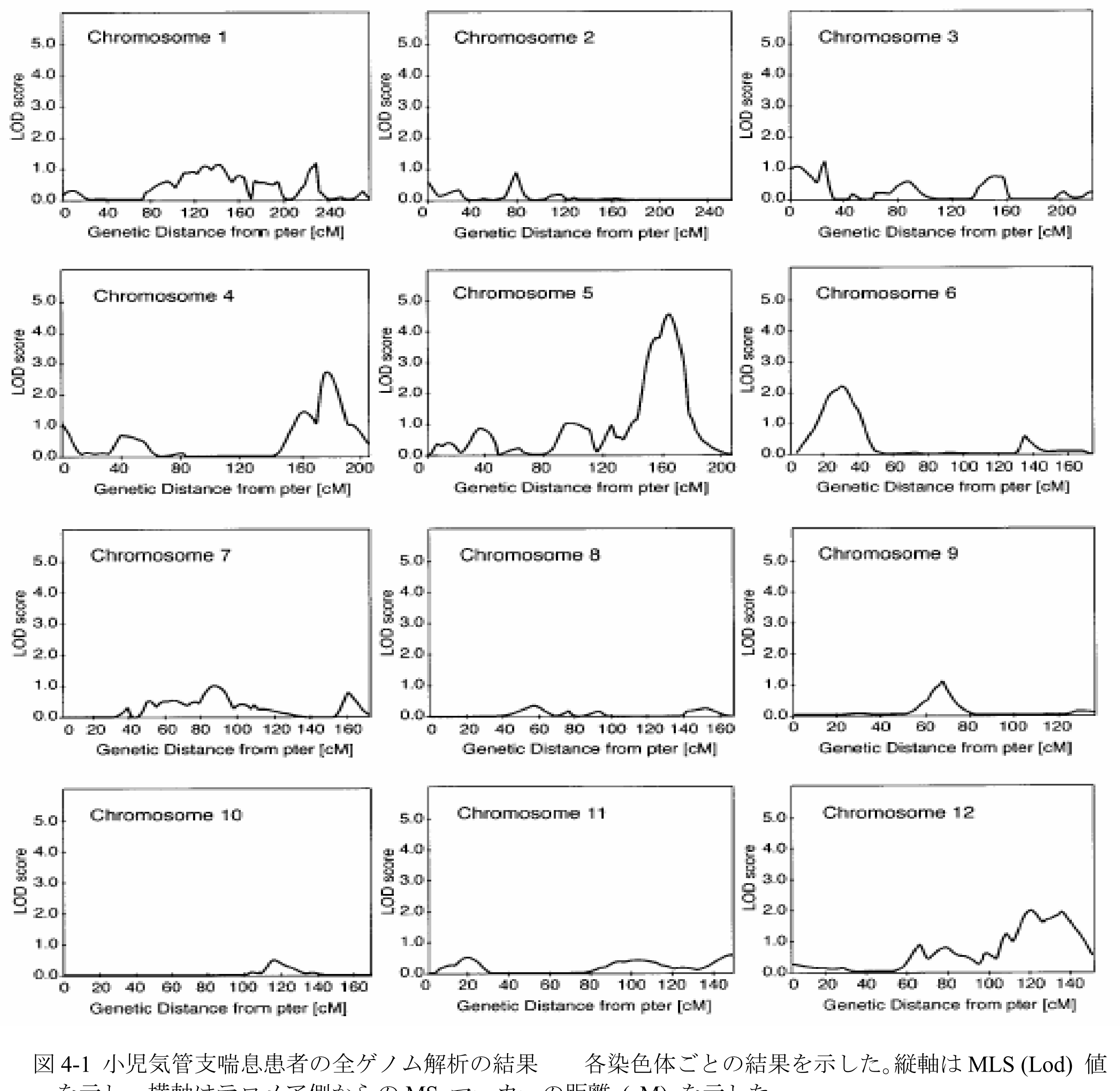


図 4-1 小児気管支喘息患者の全ゲノム解析の結果　　各染色体ごとの結果を示した。縦軸は MLS (Lod) 値を示し、横軸はテロメア側からの MS マーカーの距離 (cM) を示した。

(13q14-14.3、 Lod 2.82) にそれぞれ見られた。この領域に、疾患発症にかかわる遺伝子が存在している可能性が示唆された。そこで我々は、これら領域をさらに細かく分析し、この領域に存在し疾患との関与が考えられる候補遺伝子を解析した。これまでに第 6 番染色体上にある TNF[4]、PAFAH[5]などの遺伝子が小児気管支喘息に関連していることを見い出し、疾患感受性遺伝子として報告している。

このように全ゲノム連鎖解析法は、疾患感受性遺伝子座の検索に有用である。現在、我々はこの方法により花粉症、精神疾患などの感受性遺伝子の検索を行っている。

参考文献

[1] Y. Yokouchi, E. Noguch, S. Ito, T. Arinami, et al., Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12B locus by a genome-wide search in Japanese families, Genomics 66 (2000) 152-160.

[2] L. M. Kunkel, K. D. Smith, S. H. Boyer, D. S. Borgaonkar, et al., Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants, Proc Natl Acad Sci USA 74 (1977) 1245-1249.

[3] E. Lander, L. Kruglyak, Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results [see comments], Nat Genet 11 (1995) 241-247.

[4] E. Noguchi, Y. Yokouchi, M. Shibasaki, T. Arinami, et al., Association between TNFA polymorphism and the development of asthma in the Japanese population, Am J Respir Crit Care Med 166 (2002) 43-46.

[5] S. Ito, E. Noguchi, T. Arinami, et al., Evidence for an association between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency and increased risk of childhood atopic asthma, J Hum Genet 47 (2002) 99-101.

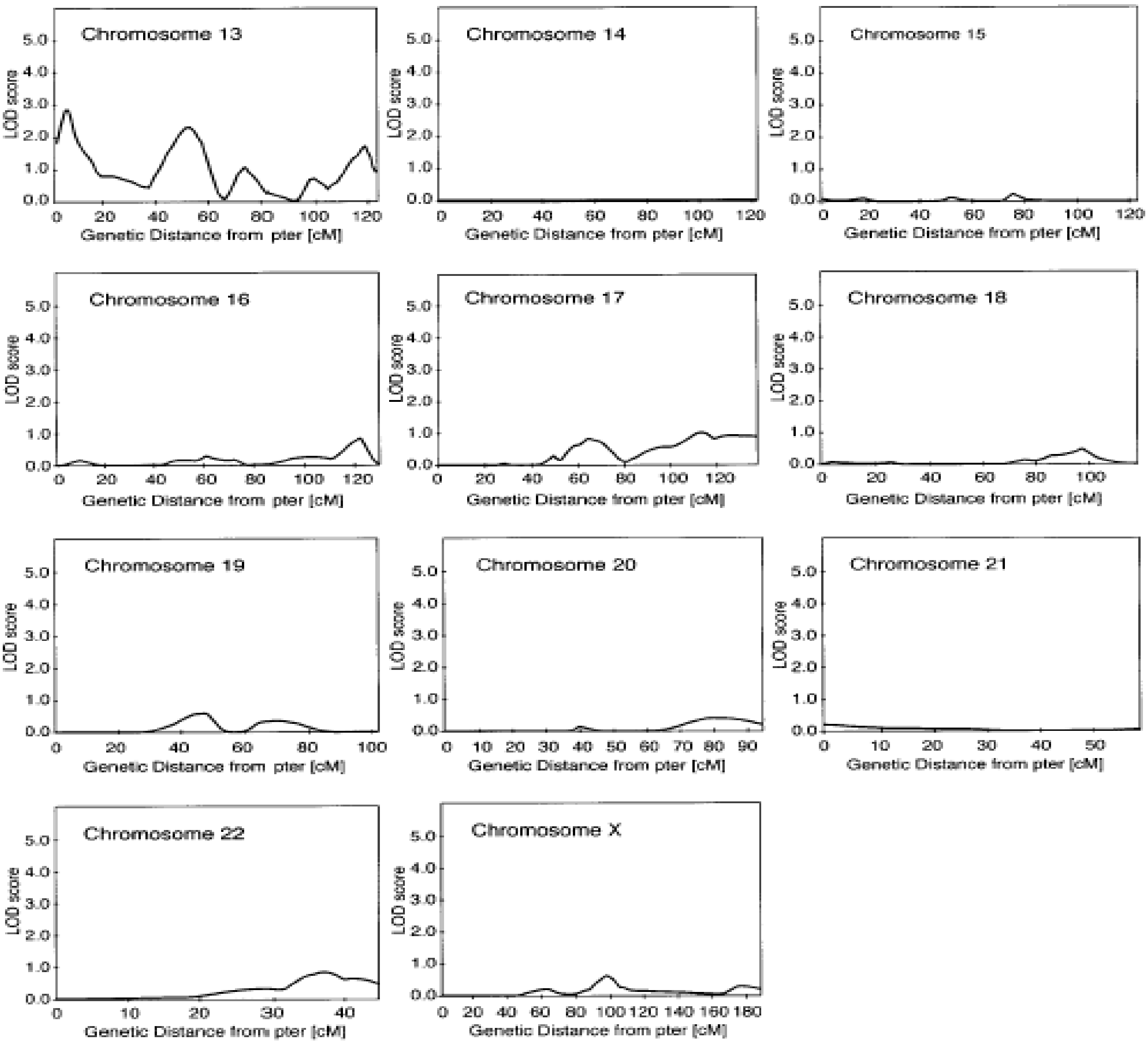


図 4-2　図 4-1 の続き

レーザーマイクロダイセクション（LMD）法による凍結組織切片からの細胞採取と nested RT-PCR 解析

小野瀬恵里子[1]
筑波大学 人間総合等教育研究支援室（医学系）
〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

レーザーマイクロダイセクション（LMD）法を利用して凍結組織切片から均質な細胞群とシングルセルを採取して、RT-PCR 解析に供与でき得る cDNA の合成を試みました。結果は均質な細胞群については概ね満足できる cDNA を合成することができました。シングルセルから数種類の RT-PCR 解析に供与でき得る cDNA 合成の可能性が確認されました。技術に関してはさらに改善の必要性があります。また今回の研究を通して非常に低濃度の cDNA は凍結融解を繰り返すことで分解してしまう可能性があることを経験しました。

１．はじめに

近年、分子生物学分野では、PCR 法（ポリメラーゼ連鎖反応による遺伝子増幅）が急速に発達、普及しました。PCR 法の最も画期的な点は、極めて微量なサンプルからでも、特定の領域の遺伝子増幅が可能なことです。そこで PCR 法を用いて疾病に関与する遺伝子の探索や発現解析の研究が盛んに行われています。

しかし、たとえばがん組織を用いて研究を行う場合、そのサンプルには相当数の正常細胞も含まれているため、そこから調整した mRNA にはがん細胞由来のものと正常細胞由来のものとが混在します。そのため、がん細胞特異的な遺伝子発現解析が妨げられる可能性があります。そこで、より正確な細胞特異的な遺伝子発現解析を行うには、均質な細胞群を単離する必要があります。それには LMD 法を活用することが有効です[1]。LMD 法の出現により、遺伝子発現解析の世界では組織特異的な解析から細胞特異的な解析へと時代の波は移りつつあります。

私が所属する膠原病リウマチアレルギー内科では各種膠原病の病態形成の理解と特異的治療を目的として、各方面からアプローチしています。全身性エリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ（RA）、シェーグレン症候群（SS）をはじめとする膠原病の病因はいまだに不明であり、臓器障害を伴う慢性炎症が病態生理上の共通した特徴です。

２．目的

私たちのグループでは SLE における腎臓組織[2]や RA における滑膜組織、SS における涙腺、口唇唾液腺[3]など病態形成に関与すると考えられる炎症部位の組織特異的な遺伝子発現解析を行ってきました。今回、より正確で特異的な遺伝子発現解析を行うために LMD 法を利用して炎症部位の組織切片から均質な細胞集団のみを採取しその mRNA を用いた、細胞特異的な遺伝子発現解析の可能性を探りました。膠原病の各種凍結組織切片から炎症部位に浸潤している T 細胞を主体として採取し、その細胞から RNA 精製を行い、RT-PCR 解析に供与でき得る cDNA の合成を試みました。

３．材料

SLE の腎組織１検体、RA の滑膜組織３検体は筑波大学付属病院で同意を取得し得られた生体組織の一部を使用しました。各組織は LMD に供するまで、OCT コンパウンドに包埋して−80℃で凍結保存しました。

４．メチルグリーン・ピロニン（MPY）染色による組織中の RNA の確認

実際に LMD 法を行う場合、組織切片中に RNA がどの程度保たれているかを事前に知ることは重要なステップです。一般に MPY 染色が簡易的に使われています。メチルグリーンとピロニンは陽性荷電の塩基性の色素で、核酸中の陰性荷電するリン酸基と結合します。核酸塩基の重合度の大きい DNA は青緑色に染色され、重合度の小さい RNA はピンク色に染色されます。

MPY 染色方法[4]は、10μｍの厚さに薄切した凍結組織切片をスライドガラスに貼り付け、１分間風乾します。100%エタノールで 4℃にて 10 分間固定後、DEPC 処理水中で包埋剤を洗い流します。組織周囲の水分をふき取り、MPY 染色液（武藤化学薬品）を組織上にのせて 4℃にて 30 分間染色します。DEPC 処理水にて洗浄後、検鏡しました。MPY 染色例を図１に示します。（A）は RA の滑膜の凍結組織切片です。細胞質がピンク色に染色され組織中の RNA が多いことを示唆しています。左下矢印部分は胚中心様部分ですが核が強く青緑色に染色されており、ピンク色には染まっていません。この胚中心様部分は核分裂が活発に行われているため DNA 量が極めて多いと推測され、RNA が存在していないのではなくて、RNA の染色がマスキングされてしまっている可能性が考えられます。（B）は SLE 腎組織の凍結組織切片です。この組織は薄切を３回繰り返したもので、ピンク色の染色が弱く RNA は分解を起こし始めている可能性があります。このような組織切片からの RNA の回収は非常に困難と考えられます。

[1] E-mail: eonose@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3332

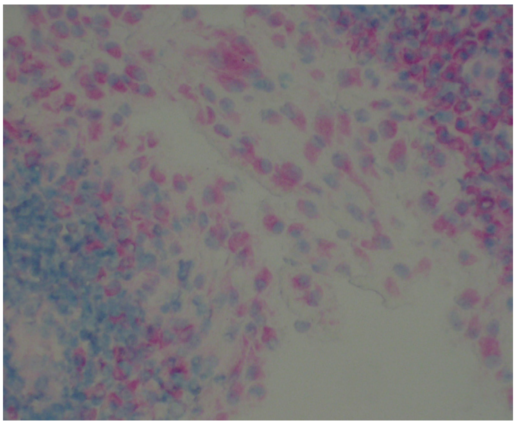


図1-A
RAの滑膜新鮮凍結組織切片
MPY染色

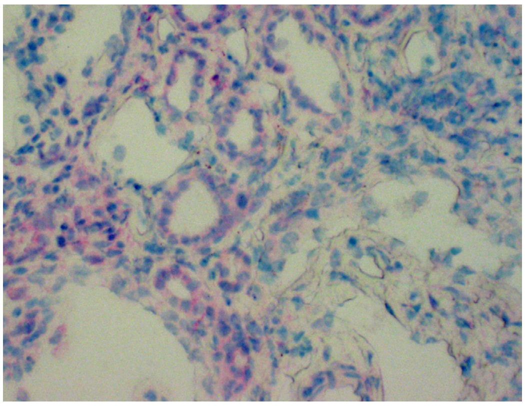


図 1-B
SLE腎組織切片MPY染色
薄切を繰り返した検体

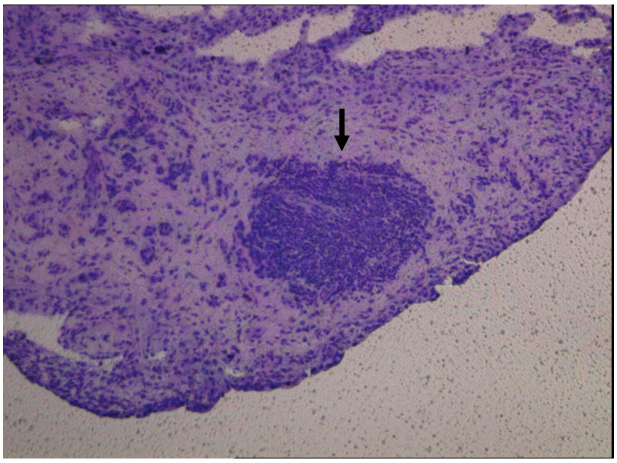


図2-A-1
RA滑膜組織トルイジンブルー染色
LMDによる細胞群採取前

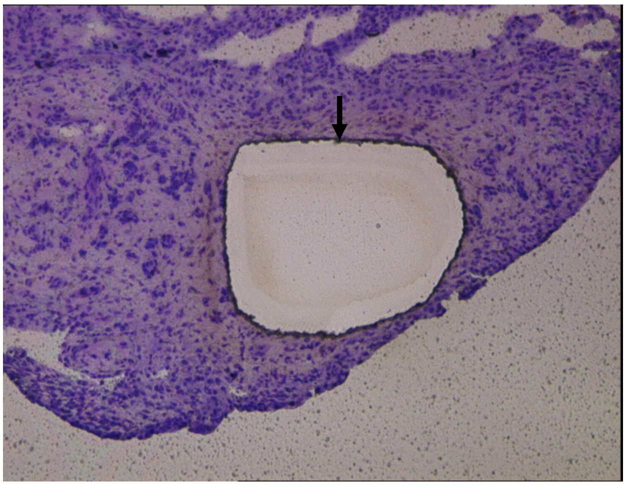


図2-A-2
RA滑膜組織トルイジンブル-染色
LMDによる細胞群採取後

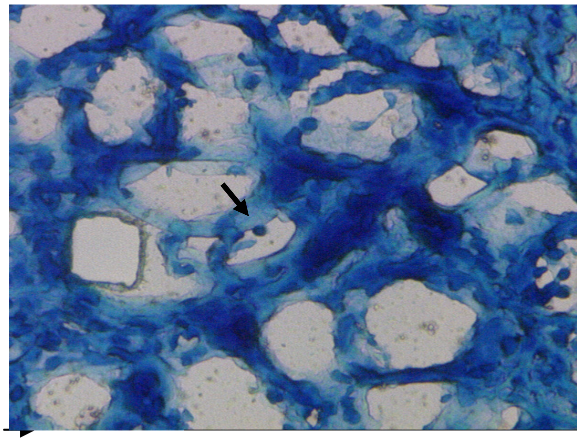


図2-B-1
SLE腎組織トルイジンブル-染色
LMDによるシングルセル採取前

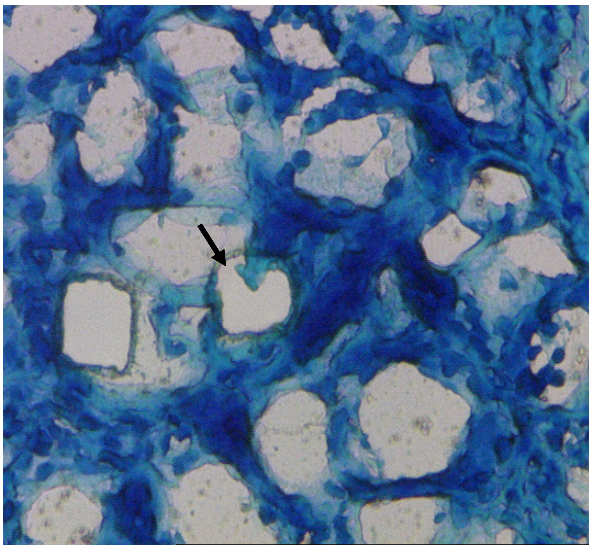


図2-B-2
SLE腎組織トルイジンブル-染色
LMDによるシングルセル採取後

５．LMD による細胞採取

LMD はレーザー光を利用して、組織切片上の目的の細胞のみを光学顕微鏡下で切り取り、採取することができます。その手順[5]は－80℃で凍結保存された組織をクリオスタットで 10μmの厚さに薄切し、フォイル付スライドガラスに貼り付けます。スライドガラス上の組織を70%エタノールで4℃において1分間固定、DEPC 処理水で包埋剤を洗い流した後0.05%トルイジンブルー溶液（pH7.0）（Wako）を組織上にのせて 4℃にて 1 分間染色しました。DEPC 処理水で洗浄後スライドガラスを真空乾燥器内で 10 分間吸引乾燥しました。そのスライドガラスを用いて LMD による細胞採取を行います。

スライドガラスは顕微鏡ステージに組織を貼り付けた面を下向きにセットします。光学顕微鏡画像は PC モニターを見ながら細胞採取したいカットエリアをマウス操作により選択し、レーザーでフォイルと共に切り取ります。切り取られた組織は重力により切除物質の収集トレー上にセットした細胞回収チューブ（0.5ml の PCR チューブ）のふたに落ちます。PCR チューブのふたにはあらかじめ ISOGEN (日本ジーン) 50μl を入れておきました（図２参照）。図 2-A は RA の滑膜組織切片から胚中心様を切り出した例です。図 2-B は SLE の腎組織切片から尿細管周囲にある細胞をシングルセルで採取した例です。

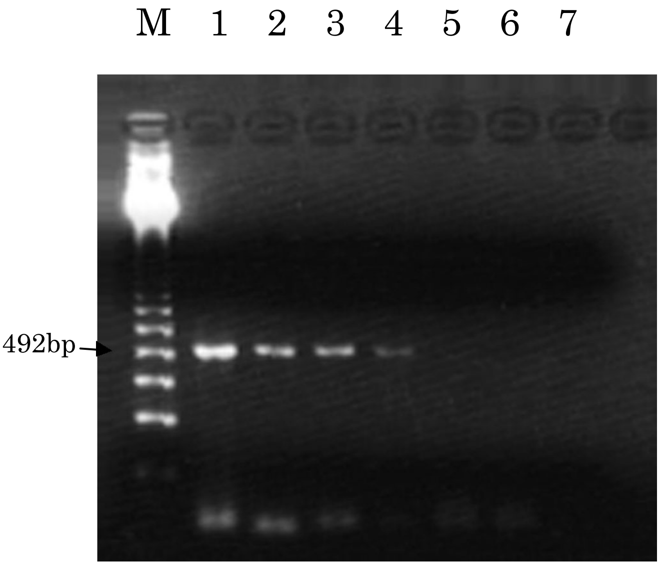


図3-A: β-actin での first RT-PCR の結果
M: 分子量マーカー（123bpラダー）
Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2,10, 1 cell相当
Lane 7: ネガティブコントロール

６．ヒト末梢血単核球（PBL）を利用した nested RT-PCR 解析

PBL から得た cDNA を使用して希釈試験を行い、nested RT-PCR の解析限界を確認しました。相当細胞個数をそれぞれ 10^5,10^4,10^3,10^2,10, 1 コになるように cDNA を段階希釈しました。プライマーはハウスキーピング遺伝子のひとつであるヒトβ－actin [6] に設定したプライマーを用いました[7]。first PCR で使用した上流プライマーは GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA,下流プライマーは CCA TCT CTT GCT CGA AGC CC で PCR 産物のサイズは 494bp です。PCR 条件は 94℃で 1 分間の熱変性反応、62℃で 1 分間のアニーリング反応、72℃で 1 分間の伸長反応の増幅反応を 30 サイクル行いました。nested PCR で使用した上流プライマーは AAA TCT GGC ACC ACA CCT TC、下流プライマーは AGG GCA TAC CCC TCG TAG AT で PCR 産物のサイズは 240bp です。PCR 条件は 94℃で 1 分間の熱変性反応、60℃で 1 分間のアニーリング反応、72℃で 1 分間の伸長反応の増幅反応を 30 サイクル行いました。

結果は増幅した PCR 産物をエチジウムブロマイドを含む 1.2%アガロースゲルにて電気泳動を行いバンドの有無を見ました。結果を図３に示します。（A）に示しましたように first RT-PCR 電気泳動の結果 10^5,10^4,10^3,10^2 コは 494bp サイズのバンドが検出されましたが、10,1 コ相当細胞数濃度のテンプレートではバンドが検出されませんでした。

（B）に示しましたように nested RT-PCR の結果、細胞数が 10,1 コも 240bp サイズのバンドが検出されました。ネガティブコントロールとしてテンプレートを加えていない PCR 産物からはバンドは検出されませんでした。

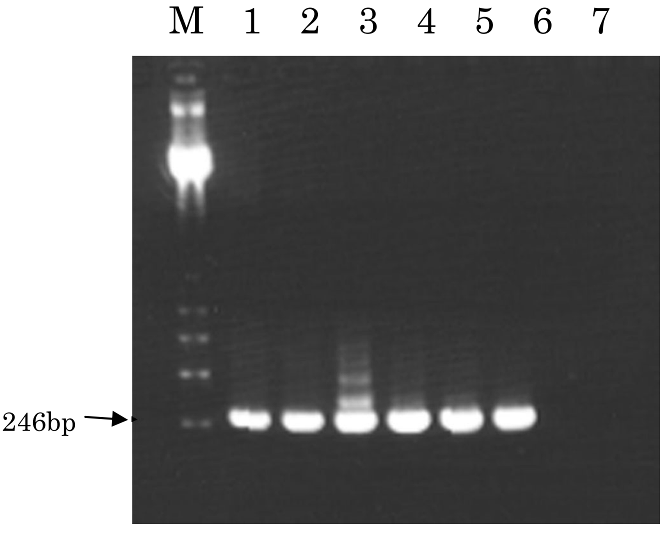


図3-B: β-actin での nested RT-PCR の結果
M: 分子量マーカー（123bpラダー）
Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10, 1 コ相当
Lane 7: ネガティブコントロール

(C）に示しましたのは－20℃の凍結保存と融解を 3 回繰り返した cDNA を用いた nested RT-PCR の結果です。細胞数が 1 コの PCR 産物からはバンドが検出不可能になりました。このことから非常に低濃度の cDNA は－20℃凍結保存、融解によって分解が引き起こされる可能性が考えられました。

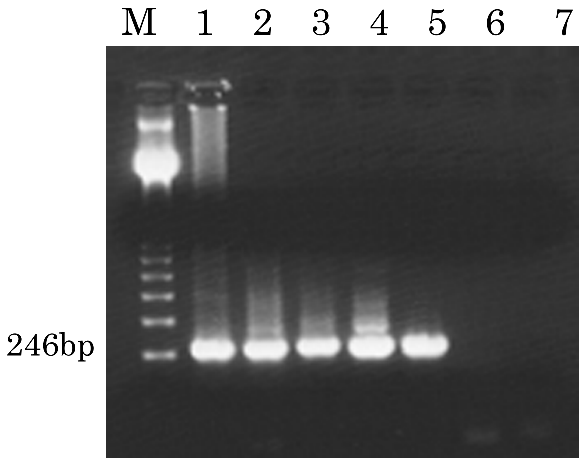


図3-C: 凍結融解を３回繰り返したcDNAを用いた β-actin での nested RT-PCR の結果
M: 分子量マーカー（123bpラダー）
Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10, 1 cell相当
Lane 7: ネガティブコントロール

７．RNA 精製と cDNA 合成

RNA は LMD で採取された細胞から ISOGEN 法を利用して Sgroi ら[7]の方法を参考にして精製しました。その手順は細胞回収チューブのふたに入っている細胞を含む ISOGEN 50μl を新たな 1.5ml チューブに移し変えてボルテックスミキサーで 60 秒間混合して細胞を完全に破砕しました。クロロホルム 10μl を加えてボルテックスミキサーで 30 秒間混合、スピンダウン後 37℃で、10 分間保温しました。4℃で、15,000rpm、15 分間遠心し、分離した 2 層のうち上層を新しいチューブに移しました。共沈剤としてグリコーゲン 10μg と上層容量の 0.1 倍量の 2.5M 酢酸ナトリウムと 1 倍量のイソプロピルアルコールを加えてよく混合して、－80℃で 30 分間放置しました。4℃で 15,000rpm、30 分間遠心し、上清を除き、70%エタノールで沈殿物をリンスしました。10 分間真空乾燥を行い、沈殿物を DEPC 水 11μl で溶解して RNA 溶液としました。

M-MLV 逆転写酵素と Oligo(dT)プライマーを用いて一本鎖 cDNA を合成し、さらに cDNA の分解を防ぐために２本鎖 cDNA を合成しました。合成キットは TaKaRa(6130)を使用しました。なお、合成した cDNA は 1 サンプル当たり 40μl に DEPC 水にて希釈して分注後、－20℃で保存しました。

８．Cβnested RT-PCR 解析

T 細胞が採取されたことを Cβ nested RT-PCR [2] を用いて確認しました。プライマーは T 細胞レセプター（TCR）のβ鎖の定常領域である C 領域に設定し、nested RT-PCR で確認しました。First PCR の上流プライマーは CCC ACA CCC AAA AGG CCA を、下流プライマーは TTG GAG CTA GCC TCT GGA ATC と CCA GGG CTG CCT TCA GAA を合わせて使用しました。nested PCR のプライマーですが、上流プライマーは first PCR と同じものを、下流プライマーは CAT AGA GGA TGG TGG CAG を使用しました。first PCR、nested PCR 共に PCR 条件は 94℃で 1 分間の熱変性反応、55℃で 1 分間のアニーリング反応、72℃で 1 分間の伸長反応の増幅反応を 30 サイクルずつ行いました。

結果は増幅した PCR 産物をエチジウムブロマイドを含む 1.2%アガロースゲルにて電気泳動を行いバンドの有無を見ました。nested RT-PCR の結果の一部を図４に示しました。384bp サイズのバンドが確認できたサンプルを T 細胞が採取され、さらに cDNA の合成に成功したと考え陽性としました。

RA の滑膜組織の中から胚中心様部分から均質な細胞群を LMD で採取し、得た cDNA の T 細胞陽性率は平均 47.9%でした。

SLE の腎組織のシングルセルから得た cDNA の T 細胞陽性率は 5%でした（表１参照）。

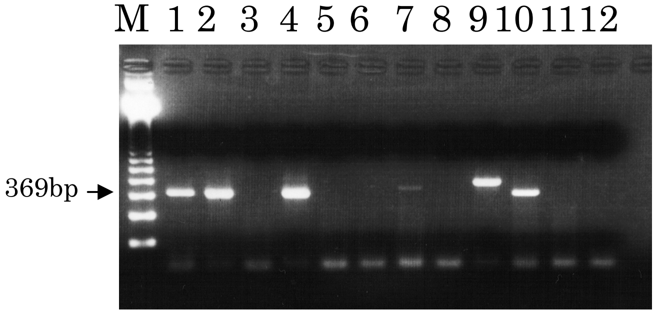


図4: Cβ nested PCR での結果
M: 分子量マーカー（123bpラダー）
Lane 1, 2, 4, 7, 10: T細胞陽性サンプル
Lane 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12: T細胞陰性サンプル

表1. LMD法による細胞採取から得たcDNAのCβnested PCR 解析

組織例	採取検体数	Cβ-PCR陽性数	陽性率(%)
RA1	24	5	20.8%
RA2	12	8	66.6%
RA3	16	11	68.8%
SLE	20	1	5.0%

９．考察

近年、LMD 法を利用した細胞特異的な遺伝子解析は各種がん組織を用いた研究が活発に行われています[8]。LMD 技術の出現により細胞特異的な遺伝子発現解析が可能となり、またシングルセル解析技術が発達すればその応用により遺伝子診断分野[9]など飛躍的に伸びると考えられています。

今回の実験において、均質な細胞群を LMD 法で採取する技術の確立についてはほぼ満足できる成績でした。RA の滑膜組織の中から胚中心様部分の細胞群の細胞採取の陽性率は平均 47.9%でした。これは、細胞採取を行う際、視覚的に採取したい細胞群を的確に切り取ることができ、さらに切り取られた細胞数も 50 コから 300 コで、RT-PCR 解析に必要な十分な濃度の cDNA を合成することができたものと考えられます。一方で、SLE の腎組織からの T 細胞のシングルセル採取の陽性率は 5%でした。陽性率の低さの原因として、染色方法と RNA 量が非常に微量だということが考えられます。LMD 法で cDNA 合成までの課程を成功するためには凍結組織切片作成から染色、細胞採取、RNA 精製、cDNA 合成まで RNA の失活を防ぐために、作業を迅速に、低温で、また確実に行う必要があります。今回、トルイジンブルー染色を採用した理由は染色時間が短く簡単で、RNA へのダメージの低さを優先したからです。トルイジンブルー染色は視覚的に細胞の種類を見極めるのが非常に困難です。従って、LMD 法で細胞を切り取る時点で T 細胞以外の細胞（B 細胞，好中球など）を採取してしまう可能性があり、また RNA の精製段階、c DNA の合成段階、RT-PCR の実施段階等で何らかの問題が起きて、このような低陽性率になったと考えられます。さらに、LMD 法で切り取った細胞は重力による自然落下で収集チューブ内に集めるのですがシングルセルは重量も非常に軽量なため、時に自然落下できず静電気等の影響を受けて舞い上がりスライドガラスに再付着してしまうことがあります。しかし、フォイル上の実際の細胞量は顕微鏡下で観察された細胞数と比べると平均 1/2 細胞相当量になります。従ってシングルセルから精製した RNA 量も平均 1/2 細胞相当量になります。その条件下で数種類の RT-PCR 解析に供与できる cDNA が合成できる可能性が確認され、組織を用いたシングルセル解析への道が開けたことは大きい成果と考えます。今後の課題は染色方法の改善であり、RNA へのダメージの低さを保ちつつ目的とする細胞を的確に採取するための免疫組織化学染色等を検討する必要[10]があると考えます。

シングルセルを用いた遺伝子解析技術の発展は個々の細胞の働きがより明確になることに繋がり、複雑な免疫応答の仕組みや病態形成の解明も夢ではなくなります。それはすなわち、私たちのグループが志している膠原病の特異的治療にまた一歩近づくことになります。

私たちのグループでは SS における唾液腺組織に浸潤した細胞を対象にした、フローサイトメトリーのシングルセルソーティングを使用したシングルセル解析の報告[11]があります。また SLE の腎組織の T 細胞が分泌するサイトカインに関する遺伝子発現解析の結果、腎組織の炎症部位に浸潤している T 細胞は Th2 細胞が多いということが示唆されました。この結果を細胞レベルで再確認するために、炎症部位からシングルセルを採取してそれぞれ個々の細胞について各種サイトカイン遺伝子発現解析をしていきたいと考えています。また今後さらに LMD 法によるシングルセル採取の技術と微量 RNA 精製および cDNA 合成方法の改善に取り組み、確実なシングルセル解析の技術の確立を目指したいと考えています。

謝辞

この研究を行うにあたり、終始熱心なご指導とご教示をいただきました筑波大学臨床医学系住田孝之教授、村田秀行講師、松本功講師、伊藤聡講師に感謝申し上げます。また、LMD システムを貸与していただきました基礎医学系内田和彦助教授に深謝申し上げます。

参考文献

[1] M. R. Emmert-Buck, R. F. Bonner, P. D. Smith, R. F. Chuaqui, Z. Zhuang, S. R. Goldstein, R. A. Weiss, L. A. Liotta, Laser capture microdissection, Science 274 (1996) 998-1001.

[2] H. Murata, R. Matsumura, A. Koyama, T. Sugiyama, M. Sueishi, K. Shibuya, A. Tsutsumi, T. Smida, Tcell receptor of Tcells in the kidneys of patients with lupus nephritis, Arthritis Rheum. 46 (2002) 2141-2147.

[3] I. Matsumoto, K. Tsubota, Y. Satake, Y. Kita, R. Matsumura, H. Murata, T. Namekawa, K. Nisioka, I. Iwamoto, Y. Saitoh, T. Sumida, Common Tcell recepter clonotype in lacrimal glands and labial salivary glands from patients with Sjogren’s syndrome, J. Clin. Invest. 97 (1996) 1969-1977.

[4] 佐野豊，組織学的研究法，南山堂 (1981) 441-451.

[5] K. Kolble, The LEICA microdissection system;design and applications, J. Mol. Med. 78 (2000) B24-25.

[6] S. Xin, K. Jorg, Z. Zhao-Wen, S. Bruno, T. Wen-Hao, Z. Arthur, W. B. Markus, F. Helmut, Gene-expression analysis of single cells nested polymerase chain reaction after laser microdissection, World J. Gastroenterol. 9 (2003) 1337-1341.

[7] D. G. Sgroi, S. Teng, G. Robinson, R. Levangil, J. R. Hudson, Jr., A. G. Elkahloun, In vivi gene expression prpfile analysis of human breast cancer progression, Cancer Res. 59 (1999) 5656-5661.

[8] A. K. Dixon, P. J. Richardson, R. D. Pinnock, K. Lee, Gene-expression analysis at the single-cell level, Trends Pharmacol. Sci. 21 (2000) 65-70.

[9] R. Todd, D. H. Margolin, Challenges of single-cell diagnostics; analysis of gene expression, Trends in Molecular Medicine, 8 (2002) 254-257.

[10] L. Fink, T. Kinfe, M. M. Stein, L. Ermert, J. Hanze, W. Kummer, W. Seeger, R. M. Bohle, Immunostaininng and Laser-assisted cell picking for mRNA analysis, Laboratory Investigation 80 (2000) 327-333.

[11] I. Matsumoto, S. Okada, K. Kuroda, I. Iwamoto, Y. Saitou, T. Tokuhisa, K. Nishioka, T. Sumida, Single csll analysis of Tcells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjogren’s syndrome, Int. J. Mol. Med. 4 (1999) 519-527.

筑波大学内 Web データの全文検索システムの構築

佐藤守
筑波大学 研究協力部研究協力課（学術情報処理センター）
〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

筑波大学内 Web データを対象とした検索システムを構築し，筑波大学公式ページ内を検索対象範囲に限定した検索サービス[1]として利用を開始した．本稿では日本語全文検索システム構築と運用に関する取り組みを紹介しながら，ログ統計の有効活用について報告する．

１．はじめに

筑波大学の公式ページでは，学外の方に対する情報提供を行うサービスとして Web 検索システムを導入し，大学が保有する大量のデータの中から目的の情報を効率よく提供するための手段として活用されている．この検索システムは，検索対象が中規模程度でも検索要求に対する応答時間の高速化が期待できる Namazu[2]を検索エンジンとして採用するとともに，各検索対象サイトからのデータ収集を行うために wget[3]というソフトウェアを利用している．収集したデータを事前にインデックス化する処理を含め，これら一連のデータ更新を無人で実施するためのスクリプトを作成することによって，定期的に自動実行することで円滑な運用が可能となった．（図 1）

２．学内 WEB データの収集方針

2.1 学内サイトの不特定収集による予備評価

検索システム構築当初(2002 年)は収集対象の URL を特定せずに筑波大学公式ページを起点とし，そこからリンクを辿り学内サイトについてデータ収集を行った．起点からの収集深度を 10 に設定して Web データの収集を行った際, 216 サイト(重複分を除く)の情報が集まった．収集対象のデータタイプを指定せず画像等も全て収集していたため，合計ファイル容量は約 13GB になり約 14 時間を費やした．同じ収集を行った場合に，現在では図書館情報大学統合分が追加となり，収集時間とデータ量がさらに増加することになる．また，このようなアクセス間隔を設けずに大量のデータを連続的に収集する方法では，収集対象の各サイトに対して高負荷となるため改善する必要があることが判明した．

2.2 特定サイトのデータ収集による評価

次に収集対象データタイプを HTML 文書等に限定することで収集時間とデータ収集量を軽減し，学内の主要な Web サイト(110 サイト)を収集対象とし，深度を徐々に深くしながらデータ収集を実施した．深度毎のデータ収集の傾向について図 2 に示す．ネットワークや各サイトの状態により多少の変動が深度毎にみられるが，収集時間は収集量にほぼ比例し，平均収集速度は 76KB/s であった．さらに高速化したいところであるが，各 Web サーバの運用妨害とならぬようにするためには，収集時のアクセス間隔等を調整しながら時間を掛けて収集することも必要である．

図１．筑波大学公式ページ内の検索

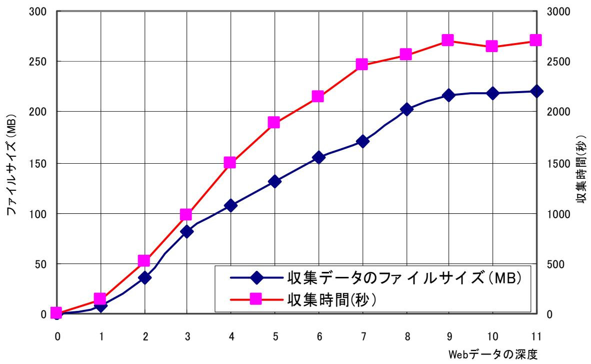


図２．深度毎のデータ収集時間と容量

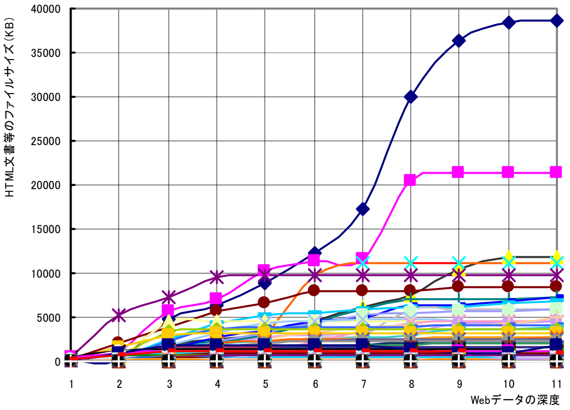


図３．学内 Web サイト別深度毎データ収集量

---

1 http://www.tsukuba.ac.jp/~robots/ja/index.html
2 http://www.namazu.org/
3 http://www.gnu.org/software/wget/

2.3 最終深度の予測

収集したデータを Web サイト別に分けて深度毎のデータ収集量について調べた．（図 3）
図 2，図 3 ともに深度 10 で飽和状態になることがわかる．そこで，この 2 つの図において深度 11 のデータを深度 inf（無限）でデータ収集した際の数値に置き換えて表示してみた．無限深度での数値が深度 11 での曲線に調和していることから，学内主要 110 サイトにおける収集可能なWeb データの起点（公式ページ）からの最終深度を 11 と予測できる．以上の結果から現在はデータ収集時の上限値として深度 11 に設定し，各 Web サーバへの負荷を軽減するための配慮としてアクセス間隔を 3 秒程度に設定し，30 時間以上かけてゆっくりデータ収集を行っている．

3．検索システムにおける日本語の取扱い

はじめにで述べたように，本検索システムは Namazu を検索エンジンとして採用しているが，その際，日本語文書を検索システム用にインデックス化する過程において単語単位に分割する分かち書き処理に KAKASI[4]を利用している．これには付属の辞書があり単語単位に読みと漢字等のペアで構成（約 12 万件）されている．この辞書だけでも普段使用している一般的な日本語であれば分かち書きの辞書として十分機能する．ただし学内に存在する各種専門分野で使用される専門用語に関する検索では，期待する検索結果を得られない場合もある．検索精度を向上させるためには，分かち書きに用いる辞書の強化を行うことで解決できる．幸いインターネット上には各分野の辞書等[5]が存在し入手可能である．しかし辞書の書式は様々なので KAKASI 用辞書の書式に変換する必要がある．そこでスクリプトを作成し，重複分を排除しながら簡単に変換できるようにした．現在，医学，法学，地球物理学，生命科学の辞書を追加し合計約 17 万件を登録して利用している．必要に応じてさらに辞書の強化を行う予定である．

4．検索システムの利用状況

検索システムを稼動してから現時点で 3 ヶ月経過した．この間に記録された Web サーバのアクセスログをログ解析ソフトの Analog[6]を用いて，検索システムに関する利用状況を調べた．学内外から平均 28548 件/月の検索があり，日毎の検索件数（図 4）では平均 930 件/日であった．このうち学外からの検索は各月ともに 80%を超えていて全体の平均では 82.6%であった．曜日毎の検索件数（図 5）では平日の火曜日～水曜日が最大となり休日には減少する傾向がわかる．時刻毎の検索件数（図 6）では，16 時～17 時の間でアクセスが最大となることもわかる．これにより検索システムの稼動状況が把握でき，システム作業等を行う場合に，負荷の少ない曜日や時間帯を選択するなど運用面に反映しながら検索応答性能の維持に役立てることができる．

[4] http://kakasi.namazu.org/
[5] http://www.kusastro.kyoto-u.ac.jp/~baba/dic/free-dic.html
[6] http://www.analog.cx/

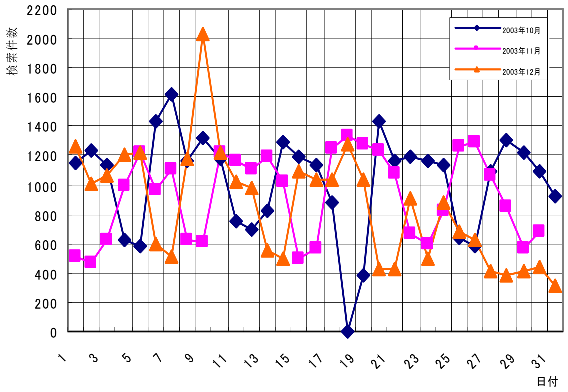


図４．日毎検索件数

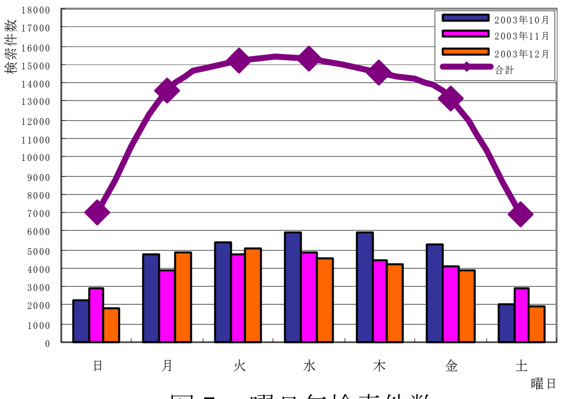


図５．曜日毎検索件数

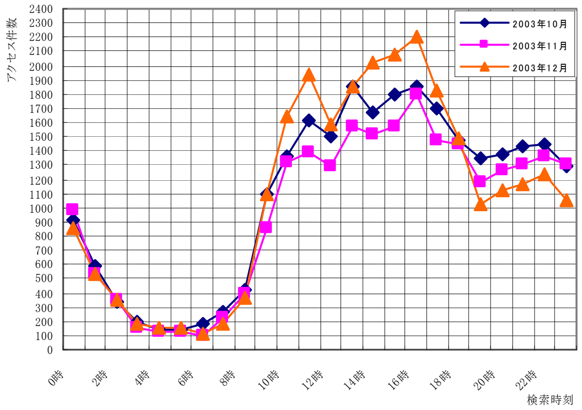


図６．時刻毎検索件数

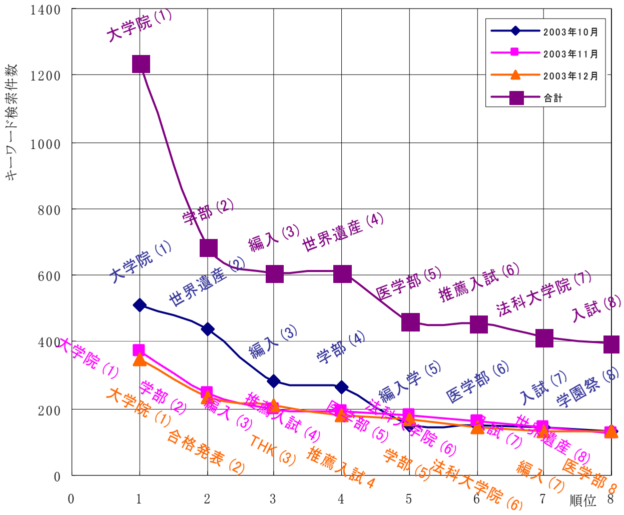


図７．検索キーワードランキング TOP8

５．検索システムの応用

検索システムでは，検索するキーワードが入力されるため，検索の目的や意図が多少なりとも含まれている．少数のログでは意味を持たないが，大量のログを統計処理して抽出したキーワードの上位ランキングから大学に対する関心事項等が時間経過とともに把握可能である．Namazu のログを解析するツールとして nlview.cgi[7]を利用し，学外からの検索キーワードと検索回数について調べ，上位 8 位までを（図 7）に示した．「大学院」というキーワードが各月とも第 1 位であり学外からの関心が高いことがわかる．また，同じ意味のキーワードでも文字が一文字でも異なると別のキーワードとしてカウントされてしまうため，キーワードの内容とランキングの結果が必ずしも検索の実態を反映しているとは限らない．

６．検索キーワードの総合的な比較

図 7 では「大学院」とは別に「法科大学院」というキーワードもあり，同様に「学部」「医学部」や「編入」「入試」「推薦入試」などから共通のキーワードとして「大学院」「学部」「入」が含まれている．共通キーワードを含む集合について調べることにより総合的な比較ができるようになる．そのためには検索キーワードから指定した文字列に関して解析するツール（図 8）が必要となり次の２つの機能を作成した．

図８．キーワード検索用ツール

6.1 検索キーワードの文字検索機能

これは学内，学外などの対象データ範囲を選択し，指定した期間における検索キーワードについて文字列検索を行い，統計処理してランキング表示する機能である．例えば「大学院」という共通キーワードで学外からの検索について調べてみると，「法科大学院」「連携大学院」「大学院入試」「夜間大学院」「社会人大学院」など 462 種類 2515 件のキーワードがランキング表示される．これにより共通キーワードの母集団同士の比較等が可能になり，総合的な評価を行う際に役立てることができる．

6.2 検索キーワードの文字出現頻度比較機能

これは 6.1 の機能と同様に対象データ範囲と期間を指定し，その間の検索キーワードについて１文字単位に分割し文字の出現頻度を比較する機能である．

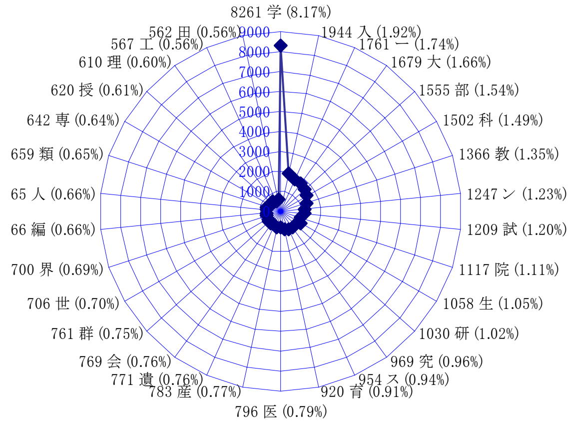


図９．文字出現頻度 TOP30（10 月）

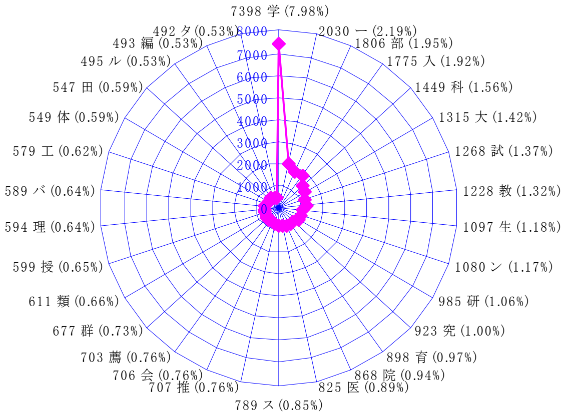


図１０．文字出現頻度 TOP30（11 月）

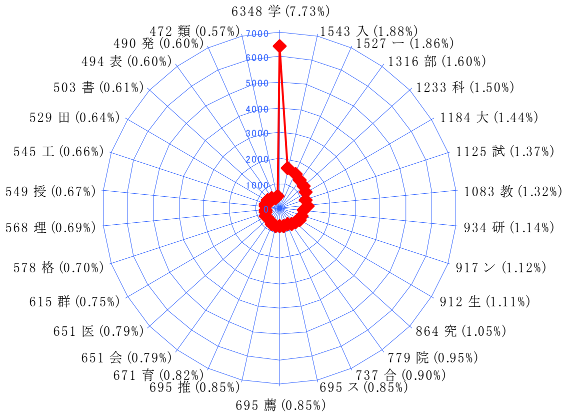


図１１．文字出現頻度 TOP30（12 月）

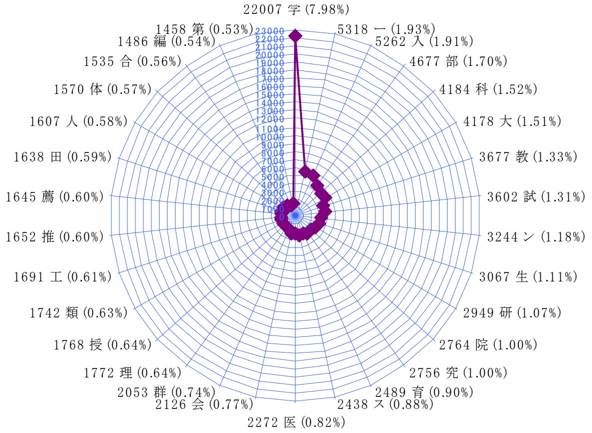


図１２．文字出現頻度 TOP30（合計）

7 http://village.infoweb.ne.jp/~fwnk1502/data/howto2.htm

この機能により検索頻度の高い文字を把握でき，さらにその文字を 6.1 の機能で再検索することで, 通常のキーワードランキングでは見えないランキングの把握も可能となる．図 9～図 11 は，2003 年 10 月～12 月の各月毎の検索文字出現頻度を表しており，図 12 はその合計である．検索されたキーワードにおける時期的な関心の移り変わりが浮かび上がる．
10 月には「世」「界」「遺」「産」が登場している．
11 月には「バ」「ル」「タ」がランクインしている．
「バ」については，「シラバス」や「バスケットボール」等の各月での極端な変動はないのに対し，11 月のバレーは 10 月の約 3.5 倍の増加となり，WorldCup バレーボールの影響によるものと予想できる．「ル」についても同様で，「サークル」等に極端な変動はみられず，通常の「ル」の件数に約 2.3 倍のバレーボールの件数が加算された結果となった．「タ」については，学内の各「センター」等の検索件数に「センター試験」や「アドミッションセンター」等の入試関連の「タ」が増加した結果である．
12 月は，「合」「格」「発」「表」「書」が登場し，「書」は「願書」の増加と「図書館」「証明書」などの件数の合わせ技となった．その他は概ね定番の文字が各月ともに出現している．

6.3 検索キーワードの総合的評価

図 12 を見ると，「学」という文字が出現頻度の第 1 位で他の文字と大差があり, 大学として当然の結果となっている．その他の出現した文字と組み合わせると各種検索キーワードが想定できる. 第 2 位には，予想外に「一」という文字が登場した．「サークル」「サッカー」「バレー」「スポーツ」の 4 項目だけで 37.7%を占め, 学外からの体育系サークル等に関する関心の高さが見えてくる．「サッカー」と「バレー」の母集団を比較してみると，10 月では「サッカー」が「バレー」の 1.5 倍多かったのに対し，11 月，12 月では「バレー」が 2 倍近くに逆転し，WorldCup 効果が持続していることが観測できる．第 3 位には「入」が登場している．図 7 の合計をみると第 3 位の「編入」609 件と第 6 位の「推薦入試」455 件および第 8 位の「入試」397 件があり，この図では確認できない第 9 位の「編入学」353 件も存在する．これではランキングとして適切に評価することが難しい．そこで 6.1 の機能を利用して「編入」と「入試」について比較してみた．学外からの検索を対象データに選択し，10 月～12 月までの 3 ヶ月間における文字検索を行うと，「入試」を含むキーワードの方が 2811 件（563 種類）となり「編入」の 1469 件（197 種類）より出現頻度が高いことがわかる．このようにキーワードを母集団として比較することで，キーワードに付随する表現の広がりについても把握することができ，単純なランキングでは見えない総合的な比較が可能となる．

７．まとめ

大学独自に検索システムを用意しなくても，Google[8]や Yahoo[9]等の検索エンジンのサイト検索機能を利用すれば，大学の検索機能として活用できることも事実である．その他，商用や独自に開発した検索システムも各種存在し，高機能の検索も可能である．これらのどれを選択するかは，目的や環境に応じて選択すればよい．自前で検索システムを運用する利点は，情報の鮮度を調節できることであり，検索対象を適切に選択することにより，上質な情報を提供できることにある．検索システムを稼動してから現時点で３ヶ月経過したが，学外からの利用率をみるとその重要性を再確認できる．また，検索システムを運用することで，学外からの大学に対する関心や需要などの動向についても時間経過とともに把握することが可能となる．今後は専門分野の辞書を充実させ，全学的に検索対象範囲を拡張することで，検索システム利用者の意図する情報を的確に提供することが可能となり，さらなる利用率の増加が期待できる．これにより副次的な効果も向上し，学外の関心等を把握する手段として有効に活用できる．

検索システムの運用に際し，最後に結論として導く言葉は「アンテナ」である．つまり，検索システムがアンテナ的な役割を果たすことも可能であることを意味する．アンテナの感度を調整しながら得られたキーワードを大学運営の参考としてフィードバックすることにより，大学に求められている役割についての理解を深めることに役立てることも可能である．そのためには，情報の取り扱いに十分注意するとともに，情報の鮮度・質・量を適切に管理しながら検索システムの利便性と信頼性を向上させてゆくことが重要であり，学内における理解と協力が必要となる．

謝辞

検索システム構築の機会を与えて頂き，ご指導とご協力頂いた大学広報課関係各位，学術情報処理センター山口喜教センター長，佐藤聡講師に深く感謝しお礼申し上げます．

参考文献

[1] 馬場肇. Namazu システムの構築と活用, ソフトバンクパブリッシング(2001)
[2] 松木孝幸, 高橋基信, 太田俊哉. Analog[アナログ]Web アクセスログの高速解析ソフト, 九天社(2003)
[3] Namazu2.0 入門 URL:http://www.namazu.org/doc/tutorial.html
[4] KAKASI 漢字→かな（ローマ字）変換プログラム URL:http://kakasi.namazu.org/
[5] Analog URL:http://www.analog.cx/
[6] nlview.cgi URL:http://village.infoweb.ne.jp/~fwnk1502/data/howto2.htm
[7] 法律用語電子化辞書 LKKS URL:http://icrouton.as.wakwak.ne.jp/pub/kks/index.html
[8] 地球物理辞書 URL:http://www.chibutsu.org/jisho/
[9] 医学用語辞書 URL:ftp://ftp.kusastro.kyoto-u.ac.jp/pub/baba/dic/
[10] ライフサイエンス辞書プロジェクト URL:http://lsd.pharm.kyoto-u.ac.jp/index-J.html

8 http://www.google.co.jp/
9 http://www.yahoo.co.jp/

GAMMA10 用縦型電動発電機の分解点検

嶋頼子
筑波大学プラズマ研究センター
〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

プラズマ研究センターでは磁場によるプラズマ閉じ込め装置 GAMMA10 によりプラズマ閉じ込めの実験を行っている。このプラズマ閉じ込め磁場の定格は中央部で 5 キロガウス、両端の最強部で 32 キロガウスである。この磁場を発生させるためにプラズマ研究センターでは縦型電動発電機（ＭＧ）と電源制御装置および整流装置を有している。電動発電機の定格を表 1 に示す。平成 14 年度にこの縦型電動発電機の分解点検を行ったので、その報告をする。

１．はじめに

プラズマ研究センターの電動発電機は 1980 年に建設されてより、職員による日常点検と、製造元による年一回の定期点検を行ってきた。また、平成元年に第一回の分解点検を行い、続いて平成 7 年に第二回の分解点検を行った。その後 7 年経過し分解点検を行う必要性から、昨年度約 3 ヶ月にわたり行ったものである。今回の分解点検では懸案となっていた発電機主軸の傾斜を初めて修正することになった。

分解点検では株式会社東芝　原子力事業部が中心となりセンター内に作業所を設置、センター側電源担当の教職員と共に分解点検を進めた。

２．GAMMA10 のコイルと磁場

GAMMA10 のコイルとそれによる磁場を図 1 に示す。コイルは 5 系統のコイルからなりそれぞれの実験中の設定電流を表 2 に示す。実験中は 0.3 秒間通電することになり、通電直前に MG の回転数は毎分 441 回転になる。このため通電は 12 分間隔で行い、発電機は通電に向け加速を行うようになっている。

表 2　コイルの設定電流

コイル名	CR	RB	RT	AB	MR
設定電流[kA]	6.37	6.21	5.56	6.09	9.10

表 1　電動発電機の定格

	極数[P]	容量	回転速度[min^{-1}]	電圧[kV]	電流[A]	周波数[Hz]
誘導電動機	10	2350[kW]	582	6.6	245	50
同期発電機	16	250000[kVA]	407.3～582	18	8019	54.3～77.6

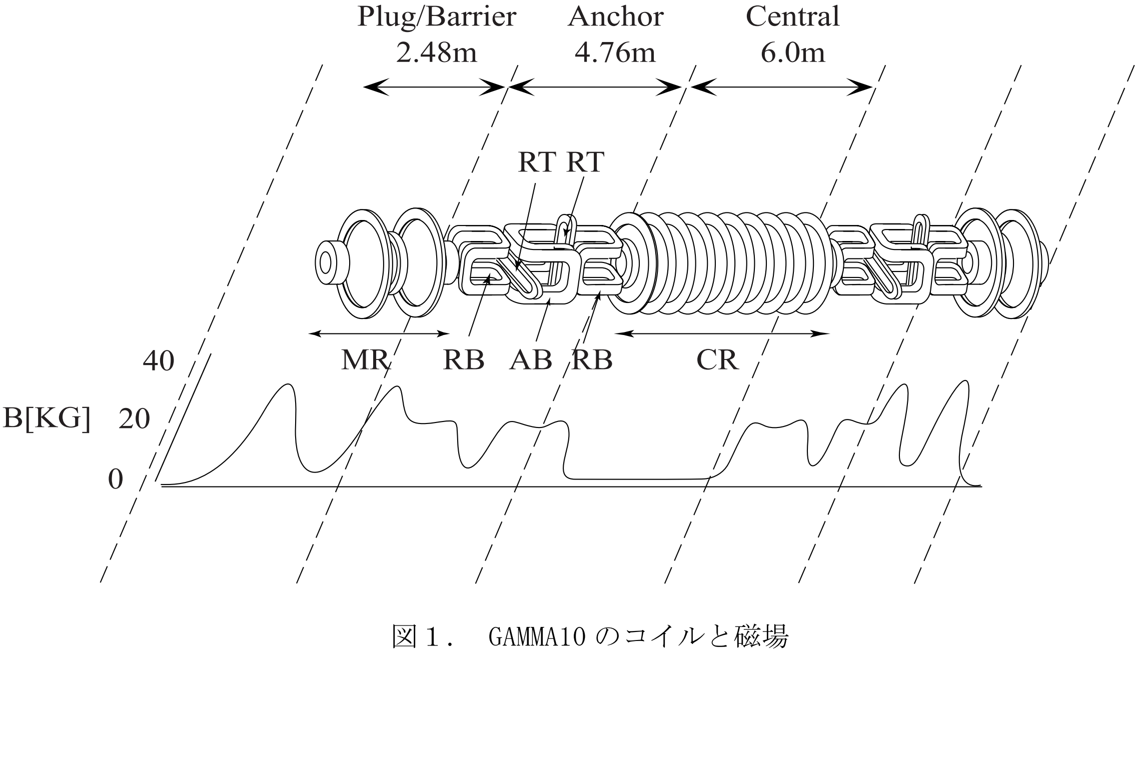


図１．　GAMMA10 のコイルと磁場

３．分解点検中の実際

3.1　分解点検

今回の分解点検では、MG本体関係の細密点検、軸傾斜修正、潤滑油更新、部品更新の他、補機関係、励磁装置関係の点検整備、電流計測器（HCT）の校正を行った。

平成１４年１０月７日より１５年１月２４日まで約３ヶ月に亘って分解点検は行われ、この期間中プラズマ研究センター内の敷地に作業所が設置された。

分解点検期間中は場にも教職員が立ち会い、毎週金曜日に作業所所長とプラズマ研究センター側教職員で作業の現状報告・次週の予定について議論を行った。重機の搬入時はセンター内の学生・教職員の安全確保の為、センター内の会議時に注意を促し、搬入時間、搬入経路等の説明等を行った。

まず分解前の運転状況確認後、発電機棟の養生を行い、絶縁抵抗、床傾斜、軸倒れの測定を行ってから分解に入った。

図２は電動機が分解され、リムブロックがクレーンで吊り上げられる様子である。発電機の周りには安全の為、柵が設けられている。

リムブロックは全部で９個あるが、１ヶ約 30ｔの重量がある。図２の写真の下の方に見えているのが、ロータースポークシャフトでこれも取り外した（図３）。

図４は最下部にあたる部分で、スラストメタルの下にはスラストスプリングというバネがある。スラストスプリングも全てはずし、スラストを解体した結果、その下の下部ベアリングブラケット（下部 BB）が腐食されていることが分かった。この為、腐食部を清掃、手入れの後位置合わせを行った。スラストスプリングも規定寸法外れのものが 7 個あり、更新した。

図５はステータの楔を打ち換えている様子である。この後、ステータの倒れ修正を行った。

図３．　吊り上げられる
ロータースポークシャフト

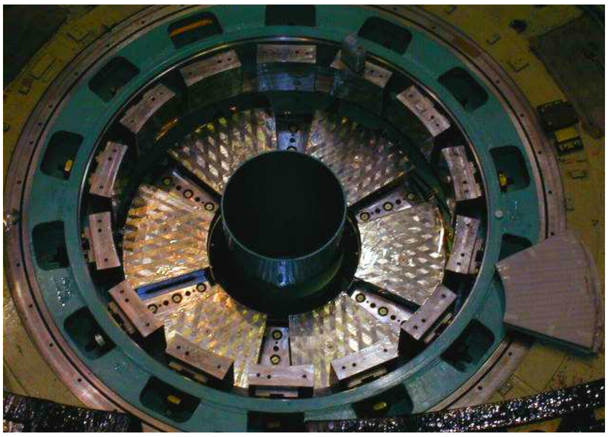


図４．　下部ガイドメタル・スラストメタル

図２．　リムブロック吊出し

図５．　ステータの楔打ち換え

3. 2 分解点検結果

予定していた修理のほかにも、分解点検中に補修の必要が判明し補修をした箇所が数箇所あった。以下に主要なものを示す。

1）下部ベアリングブラケット（下部 BB）腐食のため清掃・手入れ・位置合わせ
2）スラストスプリング劣化品更新
3）出入口弁開閉動作不良のため更新（空気冷却器）
4）軸振動監視装置センサー・ケーブル更新
5）真空遮断器（VCB）不良の為部品交換　２箇

また、MG 本体の刷子（発電機 60 ヶ，電動機 24 ヶ、接地 9 ヶ）の摩耗量測定の結果、交換の必要は無かった。

スラスト押し上げ装置について運転確認時にポンプ吐出圧力が前年度より低下していることが分かり、次回、装置の分解点検が望まれる事となった。

3.3 発電機の傾斜

今回の分解点検における一番の懸案は発電機主機軸（ロータ、ステータ）の傾斜であった。建屋のレベルと主機本体の基礎レベルの関連性を調査するため、平成 2 年 10 月より計８回に渉って傾斜測定を行ってきた。これまでの測定より、ステータ及びロータは倒れ方向はほぼ一定であるが、倒れ量は変化しながら増加傾向にあることが判明していた。今回の点検では、この傾斜の修正を行うこととなった。

まず、分解点検前に傾斜の測定を行い、上部ガイド軸受け分解後にも計測を行っておいた。さらに、底面（ステータ）の傾斜を計測し修正を行った。

修正の方法は下部 BB と下部ベース間にライナーを挿入し下部 BB レベルを修正する。これは、発電機のロータが構造上､下部 BB のスラストスプリングを介してスラスト軸受静止板により支持されており、スプリング台のレベルはロータ倒れに直接影響を及ぼす為、スプリング台のレベルを調整する必要からである。

その後、ステータフレームとステータベース間にライナーを挿入し、調整をった。図６にこの結果を示す。この修正により、ロータ倒れ修正前の傾きが 0.48mm/m だったロータは、修正後 0.09mm/m に改善された。ステータにおいては修正前が 0.55mm/m であったが修正後は 0.03mm/m に改善された。しかしながら、発電機棟建屋の床面レベル計測の結果、地盤の変動は現在も生じているようである。

H11 年 3 月から今回の修正前のデータを見る限り、ステータの倒れは安定しているが、ロータの倒れは増加傾向が強いことが分かる。これらをふまえて、今後もロータ・ステータの傾き測定と建屋の床面レベル測定を続けていくことが重要である。

4. おわりに

約３ヶ月に亘る分解点検は無事故で終えることが出来た。

通電試験の結果、各部の温度、振動、軸振れとも正常値での運転が確認された。増加していた軸倒れも修正する事が出来た。

今回の点検整備にて各部の補修を行い、良好な状態となったが、20 年以上運転を続けていることから毎年の定期点検、日常管理をしっかりと行う事が大切である。

謝辞

本報告書を作成するにあたりご助言いただきましたプラズマ研究センター板倉昭慶助教授に深く感謝いたします。

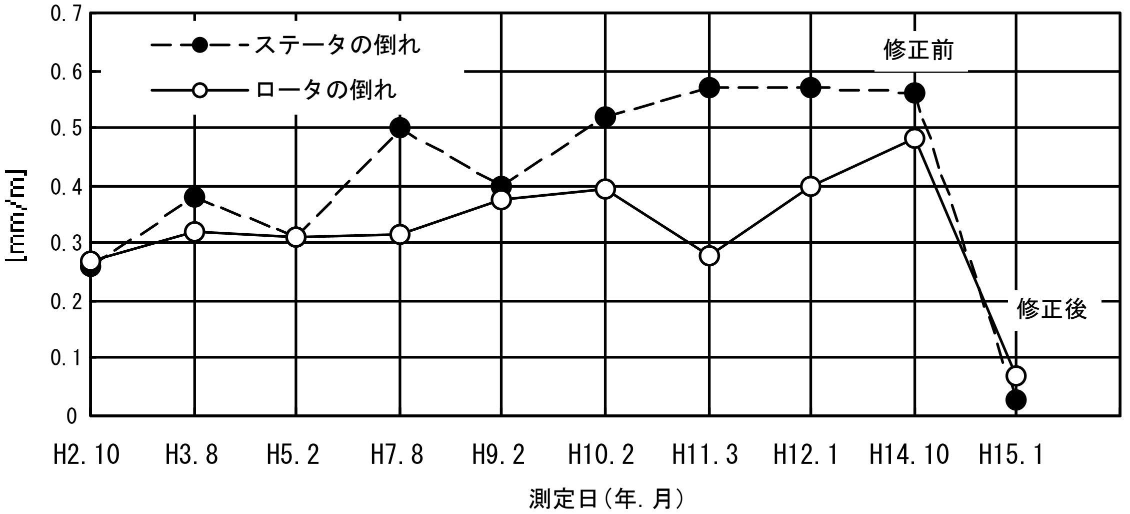


図６．　ロータ、ステータ倒れの変化

FIB 装置を用いた微細加工

室井光裕[1]
筑波大学生命情報等教育研究支援室（物質工学系）
〒305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

FIB 装置 SMI2050 が、平成 14 年度 21 世紀 COE プログラム「未来機能を創出する学際物質科学の推進」事業への補助金により導入された。
この装置を用いて TEM 観察用試料および微小部分の電気抵抗測定用試料を作製したので、FIB の紹介を兼ねて報告する。

１．はじめに

TEM（透過型電子顕微鏡：Transmission Electron Microscope)は、薄片化した試料に電子線を照射し、試料を透過あるいは回折した電子を使って試料の内部組織や構造を観察する装置です。TEM で観察するためには試料の厚さを 0.1μm 程度にする必要がある。その加工を FIB 装置で行った。

２．FIB とは

SMI2050 は、試料表面に集束イオンビーム（Focused Ion Beam：FIB）を走査しながら照射して
① 走査イオン顕微鏡（SIM：Scanning Ion Microscope）として試料表面形状の拡大観察
② 試料表面にイオンビームを照射してスパッタリングするエッチング加工
③ 薄膜原料ガスを試料表面に吹き付けながらイオンビームを照射することで試料表面に薄膜を形成するデポジション加工
を行う装置である。
イオンが照射されると、試料の表面から二次電子および二次イオンが発生する。この二次電子または二次イオンは電子信号に変換され、これらの電子信号の二次元分布が顕微鏡像として表示される。
イオンビームが試料に照射されると、試料表面の物質原子がはじき出される。スパッタエッチングは、この現象を利用して試料から物質を除去する。
試料表面に特定の化合物ガス（原料ガス）を吹き付けながらイオンビームを照射すると、化合物ガスの固体成分が試料表面に固着して堆積する。デポジション加工は、この現象を利用して試料表面に物質を堆積させる[1] 。

2.1 仕様

二次電子像分解能　5nm
最大プローブ電流密度　20A/cm^2 以上
最大プローブ電流　20nA
観察視野　0.5×0.5μm^2～2.4×2.4mm^2
イオン源　Ga 液体金属ニードル型イオン源
加速電圧　常用 30kV、5～30kV（5kV ステップ）
検出器　シンチレータ型二次電子検出器
ガス銃　カーボンガス銃／タングステンガス銃
ガス原料　フェナントレン $C_{14}H_{10}$
　　ヘキサカルボニル・タングステン $W(CO)_6$
試料ステージ
　構造　5 軸電動･ユーセントリックチルトステージ
　駆動範囲　X 軸：0～55mm
　　Y 軸：0～55mm
　　Z 軸：0～10mm
　　T 軸：-3～60°傾斜
　　R 軸：0～360°エンドレス回転
　試料サイズ　試料最大寸法　50mm 角、厚さ 12mm

2.2.FIB の特徴

1）　イオンビームを 0.01～0.1μm 径に集束させ、特定領域だけを薄片化する。このため、特定領域を観察することが容易であり、試料作製時間が短い[2]。
2）　高エネルギーの Ga イオンを用いるので、ビームに照射された部分にイオンの衝突によるダメージ層ができる。このダメージ層の厚さは約 20nm になる[2]。薄片化に際してはダメージ層の厚さを考慮しなければならない。

2.3 ビームコンディションと加工時間

Si 基板に幅 10μm、高さ 10μm、深さ 5μm の四角の穴を掘ったときの加工時間を表 1 に示す。

表 1. ビームコンディションと加工時間

Beam Condition	Probe 電流 [pA]	BeamSize [nm]	加工時間 [h:m:s]
View	0.5	13	
UFine	50	23	8：18：42
Fine	195	35	2：04：42
Mid	1318	100	0：19：44
Rough	5419	300	0：04：43
URough	11181	2500	0：02：09

View は SIM 像観察用のビームである。UFine から URough までは加工用のビームで Probe 電流が大きく

1 E-mail: muroi@ims.tsukuba.ac.jp

なるにつれて BeamSize も大きくなり、加工枠からのはみ出し量も大きくなる。

図 1 は Si 基板に同一条件の加工枠で BeamCondition を変えて加工した。

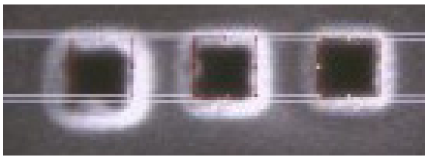


図 1．ビームによるはみ出し量

左から Mid、Fine、UFine を使用した。加工枠の周囲の白色部分はイオンビームの広がりにより削られた。したがって、大電流で加工する粗堀りの時は加工枠を目標より離す必要がある。

また、加工時間は掘る体積にほぼ比例する。

３．ピックアップ法を用いた TEM 試料作製手順

SIM 像を見ながら TEM で観察したいところを選び目標とする。

図 2 に示すようにこの目標の表面に幅 15μm、高さ 2μm、厚さ 0.5μm のカーボン膜をデポジションする。

このカーボン膜の上側と下側を、加工枠を少し離して大電流で粗堀りする。

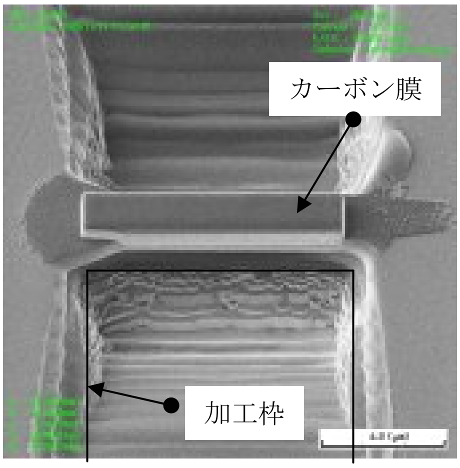


図 2．デポジションとスパッタエッチング

図 3．左のように残った部分を中掘り、仕上げ掘りを行い厚さが 0.1μm になるまで削る。

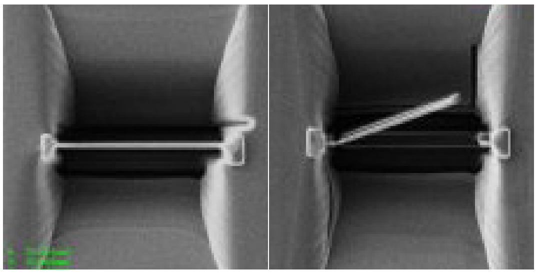


図 3．TEM 試料部分の薄片化と分離

次に底面をカットし、両サイドをカットして切り離す（図 3．右）。

試料を FIB 装置より取り出し、マニピュレータ付きの光学顕微鏡にセットする。マニピュレータには先端がφ3～5μm のマイクロピペットが取り付けられている。マイクロピペット先端でこの薄片をかるく擦ると、薄片が静電気で付着する（図 4）。

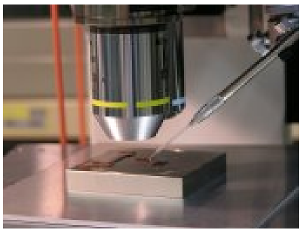


図 4．マニピュレータによる試料の取り出し

付着した薄片（図 5．左）をコロジオン膜付メッシュ上に触れさせると、薄片はコロジオン膜の粘性でメッシュに付着する（図 5．右）。

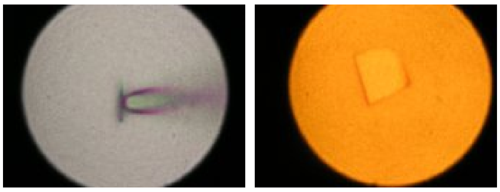


図 5．マイクロピペットと薄片

このメッシュを TEM に取り付け観察する。

図 6 は後で述べる図 9 のⅡ-Ⅳ族半導体 CdTe の高分解能 TEM 観察像（滝田研究室提供）である。

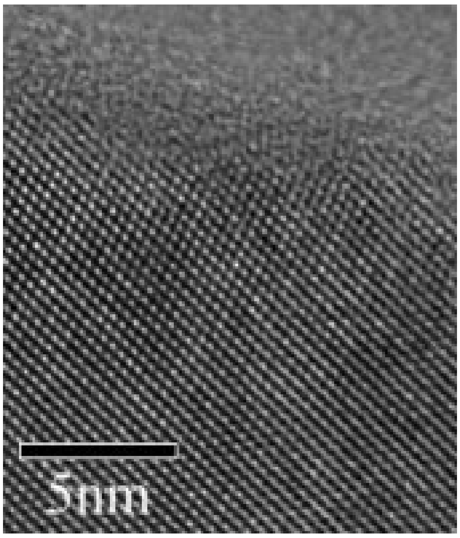


図 6．TEM 観察像

４．チャージアップによる影響

絶縁物試料を荷電粒子プローブで観察すると、そのプローブのもつ電荷により、試料表面層およびその近傍が帯電する。これがチャージアップと呼ばれる現象で、FIB 装置で用いられる Ga イオンの場合、プラス電位にチャージアップする[2]。その際、チャージアップのためにイオンビームが曲がるので、像のドリフトが起こる。

図 7．左は導電性の試料に長方形の穴を掘った。

図 7．右は同じ条件で絶縁体に掘ったが、上部の四角の穴が掘れてからチャージアップによりイオンビームが右下に流れて、指定の場所が掘れない。

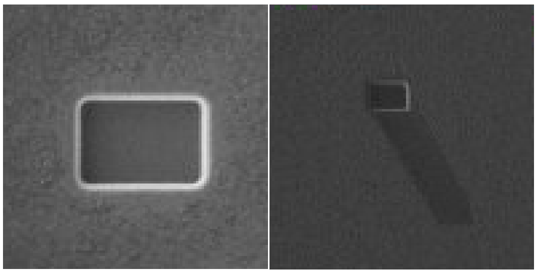


図 7．チャージアップによる影響

対策としては、試料表面に導電性の薄膜を蒸着し試料ステージと導通を取る。

５．薄片化にともなう失敗

TEM で観察するために、試料を薄くしていくが、ある程度薄くなると内部応力で歪んでくる。加工枠は長方形なので、試料が歪んで出っ張ったところが加工枠内に入ると削れてしまう。その例を図 8 に示す。図 8 上は中央の白色に見える水平部分が応力で下側に歪んだところ。図 8 下は歪んだ部分が加工枠内に入り削り取られた。

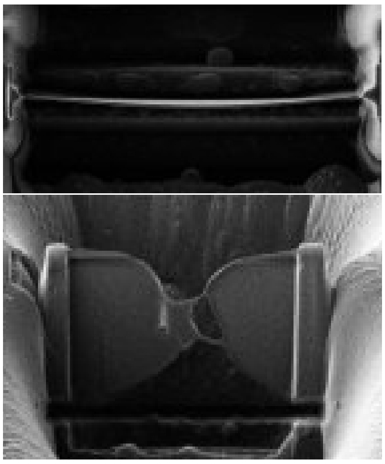


図 8．薄片化の失敗例

この応力による歪の影響を無くそうと角度を持たせた加工を試みた。

図 9 中央部の薄片試料は左から右に 1.5 度開いている。右から左に薄くなって行くので、TEM で観察する場合良い条件の箇所がある。結果は前出の図 6 である。

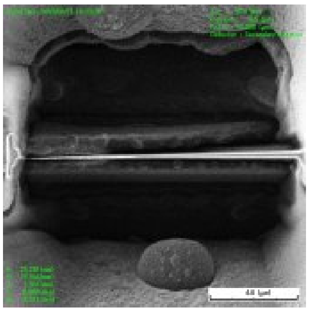


図 9．角度を持たせた試料

６．四端子法による電気抵抗測定用試料作製

絶縁体の TiO_2 基板上に導電性の CrO_2 薄膜（厚さ 0.06μm）を成長させた試料の電気抵抗を測定する。

図 10 のグレーの部分が薄膜である。A-D 間を結ぶ線幅は 100μm である。この薄膜の電気抵抗を四端子法で測定できるよう FIB で加工した。A-D 間は電流端子、B-C 間は電圧端子である。

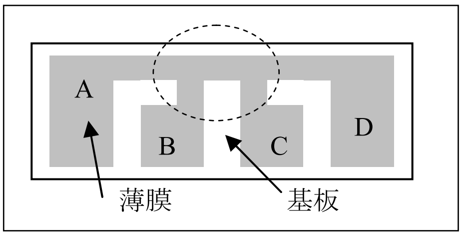


図 10．基板上の薄膜試料

図 11 は図 10 楕円内の拡大図である。グレーの薄膜から、白枠の部分を FIB で削り取る。

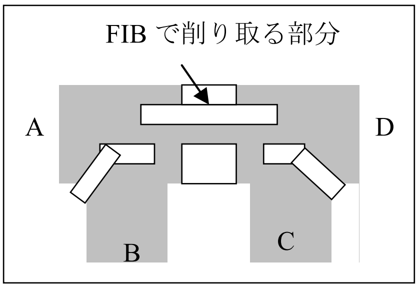


図 11．楕円内の拡大図

A-D 間を結ぶグレーの部分の幅を変えて数種類加工した（図 12）。

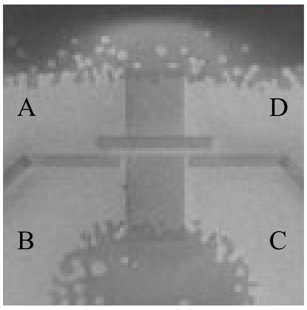


図 12．電気抵抗測定用試料

電気抵抗を測定した結果、FIB で加工された CrO_2 の細線部分で、Ga イオンが CrO_2 の不純物の働きをして比抵抗が大きくなった。

また絶縁体である TiO_2 基板のみに FIB 加工を行った結果、TiO_2 基板に Ga イオンが打ち込まれて、完全な絶縁体ではなくなってしまった、という報告を受けた。

７．FIB の加工例

次にその他の加工例を紹介する。

図 13 は $CuMnPt_6$ に 30μm×30μm の四角の穴を開け、穴が一部貫通したところで加工を終了した。深さは約 50μm で加工時間は URough で約 2 時間掛かった。図の中央部黒色部分が貫通したところ。周辺の残った薄い部分を TEM で観察する。

図 13．四角穴加工

図 14 は CdTe 基板に、ビットマップにより筑波大学の校章を掘った。

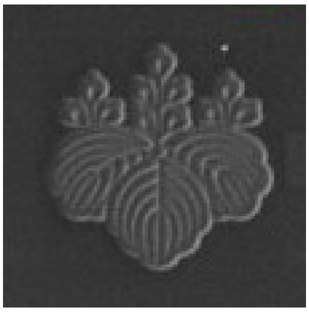


図 14．筑波大学の校章

図 15 はビットマップで、幅 1μm の溝を格子状に 1μm 間隔で加工した。図面上ではひとつひとつが正方形だが結果はビームの広がりの影響で角が無くなっている。

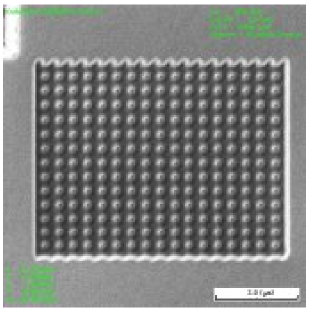


図 15．ビットマップによる加工

謝辞

この報告をまとめるにあたり、ご助言いただいた物質工学系掛谷一弘講師、高分解能 TEM 観察像をご提供して下さいました物質工学系尾崎信彦助手、ご協力頂いた大学院生の畑中歩氏に感謝いたします。

参考文献

[1] SMI2050 小型走査イオン顕微鏡取扱説明書 Rev.3.1、セイコーインスツルメンツ株式会社

[2] 平坂雅男・朝倉健太郎（共編）、FIB・イオンミリング技法 Q&A、アグネ承風社

つくば生物ジャーナルのオンライン刊行について

安部七恵[1]、丸尾文昭[2]
[1]筑波大学生命・情報等教育研究支援室（生物学類）、[2]筑波大学生物科学系
〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

昨年度、生物学類では全国の大学に先駆けて、大学の学科レベルでは他に例を見ない、月刊誌「つくば生物ジャーナル」[3]を生物学類ホームページ上に創刊しました。

今年度は、生物学類の卒業生、退官教官、在学生、生物学類教職員の論文の掲載のみに留まらず、生物学類の諸行事や生物学類の活動をまとめ、特集として掲載しました。そして「つくば生物ジャーナル」を中核とした、生物学類独自の総合的な教育支援活動の展開を試みました。

１．はじめに

国立大学の独立法人化が、平成 16 年 4 月から施行されることとなり、大学は国民や社会の要請を先取りし、迅速に対応できるよう、積極的に教育や研究の改革に取り組まなくてはなりません。その取り組みへの大きな一歩として「つくば生物ジャーナル」は生まれました。

「つくば生物ジャーナル」は、生物学や生物学類に関心を寄せてくださる様々な方々の研究や意見の発表の場そして意見の交換や議論の場となり、さらには生物学類の知的財産を広く社会に還元する場としての活動拠点です。

２．特集の企画

平成 14 年 9 月の創刊当初は、生物学類の卒業生の方々や退官教官の方々からの投稿が多くあり、月当たりの掲載本数も充実したものでした。つくば生物ジャーナル編集委員会の委員を中心に、周囲の方々へ原稿の執筆依頼を積極的に働きかけ、原稿を寄せてくださるのを待っておりました。しかしこれでは、月により投稿数に偏りがあり掲載される本数にも影響してしまいました。

そこで、今年度は投稿してくださるのを待つという受身的な状態ではなく、生物学類の諸行事や生物学類の活動等をまとめ、特集として、つくば生物ジャーナルに掲載することを企画しました。

生物学類の行事及び活動としての特集は、

・入学
・大学説明会
・生物学類授業担当教官の研究紹介
・ホームカミングデイ
・生物学類国際交流
・生物学類クラス連絡会
・生物学類シラバス
・卒業研究発表会要旨集
・卒業，退官

などです。

３．授業内容と教官研究内容の公開

今年は特に、生物学類授業担当教官の研究紹介と生物学類シラバスの掲載に、積極的に取り組みました。教官の研究内容と生物学類の授業科目の内容を明確に提示することにより、入学後の学生が、早い時期に自身の進路を決め目標を持つことができます。

また、生物学類のホームページには、E-mail での問い合わせのコーナーが設けてあります。主な問い合わせの内容は、将来このような研究をしたいと思いますが、筑波大学生物学類ではその研究ができますか。将来このような職業に就きたいのですが生物学類卒業後その職業に就くことはできますか。○○先生の講義内容や研究内容を教えてください。などで、生物学や生物学類に興味を持つ高校生や他大学の学生からの質問が、多く寄せられてきます。このような疑問を持つ学外の方々が、筑波大学生物学類の教育の特色や研究内容を知ることができるようにと、教官の研究紹介とシラバスの掲載に力を注ぎました。

４．生物学類授業評価の全面公開

平成 16 年の 5 月号には、生物学類授業評価についての特集を企画しています。生物学類では、平成 15 年 6 月から全学に先駆けて TWINS(Tsukuba Web-based Information Network System)を用いた生物学類生による授業評価を導入しました。

生物学類では、TWINS 以前からも授業評価を実施しており、大学入学まもない１年生の必修科目である生物学諸分野の概論１２科目（現在概論は８科目）の授業評価を行っていました。授業の最終日に、学生が回答したアンケート用紙を回収し、その１枚１枚を手作業で集計し、改善点などの意見も手入力していました。このアンケートの結果が、そのまま教官の授業評価となるので、厳正かつ慎重に行わなければならない、時間のかかる気の抜けない作業でした。TWINS を用いた授業評価は、この労力を軽減し、さらに概論科目だけではなく、生物学類開設の全授業科目にまで網羅することができました。

生物学類が独自に行った TWINS を用いた授業評価では 56%の回答率を得ることができました。この高い回答率と学生の建設的な授業への意見を受けて、

---

1 Tel: 029-853-4879
2 Tel: 029-853-6669
3 http://www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb/

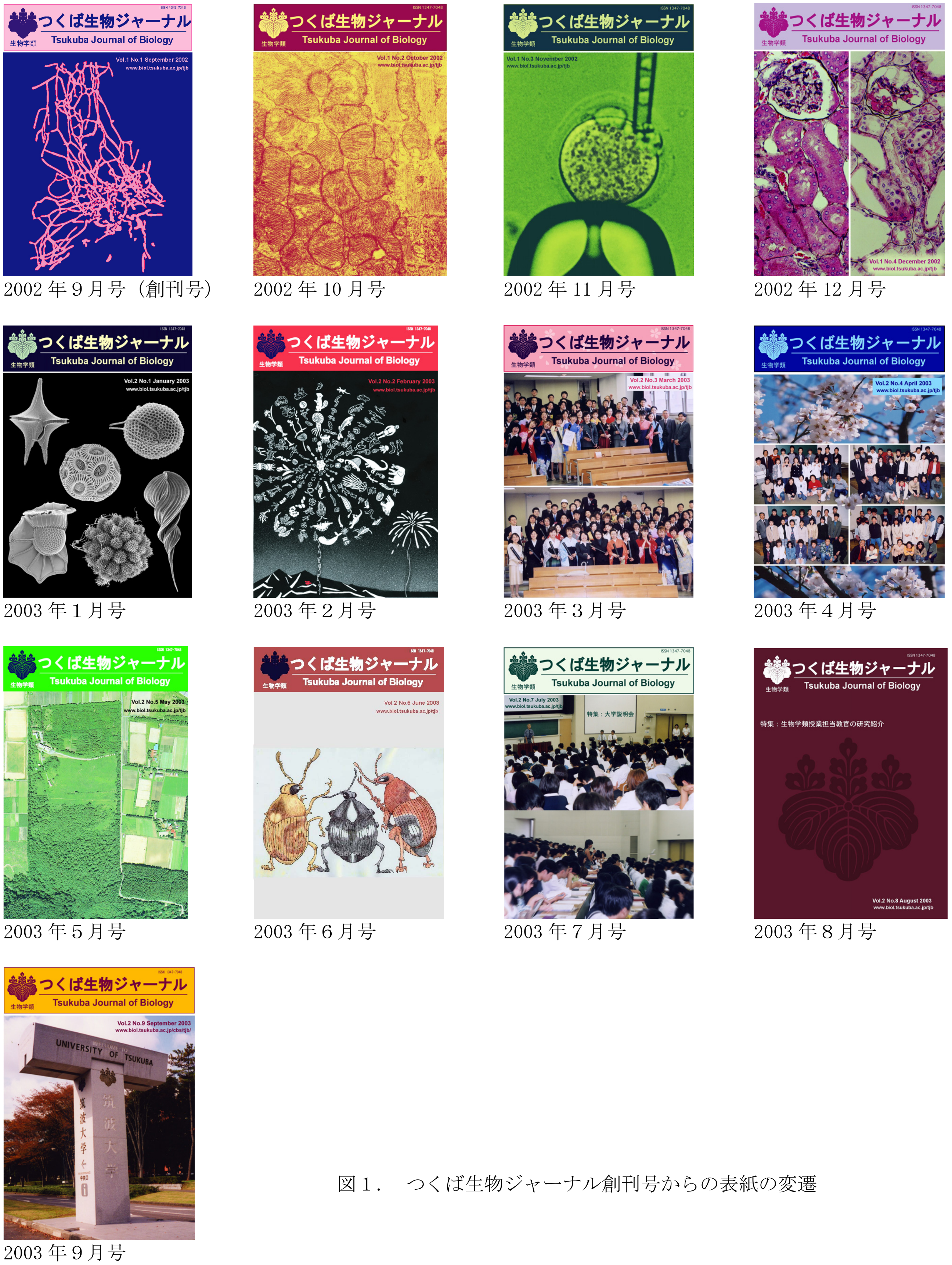


図1．　つくば生物ジャーナル創刊号からの表紙の変遷

つくば生物ジャーナルへの掲載を決めました。

5. 生物学類 OB からの投稿

卒業生や退官教官からの投稿も充実しています。今年度は、口頭の依頼のみではなく、文書による原稿執筆のお願い（図２）を作成しました。執筆していただきたい原稿の内容や、原稿の締め切り日などを明記しホームカミングデイ等の行事を活用し、積極的に原稿を募りました。

平成15年9月号10月号11月号では国立大学の独立法人化についての特集を企画し、卒業生や退官教官から貴重な意見を投稿していただきました。特集以外にも、社会の様々な方面で活躍している卒業生の方々より、それぞれの視点から生物学や生物学類への考えのみならず、人生そのものの生き方・考え方なども寄せられており、生物学に関心ない方でも、十分に楽しんでいただける内容あるものとなっています。

様

つくば生物ジャーナル編集委員会委員長
筑波大学　生物学類長　　林　純一

「つくば生物ジャーナル」原稿執筆のお願い

筑波大学生物学類発行の月刊オンラインジャーナル「つくば生物ジャーナル」に以下のように原稿を賜りたく、よろしくお願い申し上げます。なお、投稿の手引きを添付いたしますが、不明の点は何なりと編集事務局にお問い合わせください。

原稿の内容：

原稿の字数：　本文に文字だけで４，７００字まで入ります。（見開き２ページで構成しますので、写真、図表のスペースの分だけ入る文字数が減ります。初稿では厳密に文字数あわせしていただく必要はありません。）

締め切り：　　　年　　月　　日

原稿送付先：　e-mail: tjb@biol.tsukuba.ac.jp
（または、つくば生物ジャーナル編集委員会宛郵送）

つくば生物ジャーナル編集委員会／編集事務局
e-mail: tjb@biol.tsukuba.ac.jp
〒305-8572 つくば市天王台　筑波大学生物学類
TEL:029-853-4553 FAX:029-853-6300
http://www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb/

図２．　つくば生物ジャーナルの原稿執筆依頼書

６．学外の方からの投稿

「つくば生物ジャーナル」は、誰でも自由に生物学類ホームページから閲覧でき、そして誰でも自らの意見をジャーナルに投稿することができます。原稿は、論文審査の上、オンラインジャーナルに掲載され、さらに採択された投稿者には、知的所有権が与えられるという、自由と公共性に富んだシステムとなっています。

今までは、生物学類OB・在学生・教職員からの投稿のみでしたが、今年は、全くの外部の方からの投稿も寄せられ、「つくば生物ジャーナル」が広く社会に受け入れられ浸透しつつあることを実感できました。

７．おわりに

今後さらに、「つくば生物ジャーナル」を活用し、筑波大学以前よりの長き伝統に育まれた生物学類の知的財産を広く社会に還元し、生物学類の教育支援活動をより一層充実していきたいと思います。

酵素部分欠損による神経疾患とその遺伝子解析

新里寿美子
筑波大学人間総合等教育研究支援室（医学系）
〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

運動ニューロンが選択的に変性する筋萎縮性硬化症（ALS）に代表される原因不明の神経難病の中には、ある種の酵素異常で類似の症状を起こすものがある。これらの病気は常染色体劣性遺伝で、成人例では非典型的な経過をたどるものが多い。神経内科ではこれらの病気の診断の一貫として、白血球ライソゾームにおける６種の酵素活性の測定を行っている。今回はβ-ヘキソサミニダーゼ活性に異常のあった患者の例を発表する。酵素活性は正常にくらべ１０％程度で、β-ヘキソサミニダーゼの A 活性と B 活性の両者の低下から Sandhoff 病が疑われた。

１．はじめに

β-ヘキソサミニダーゼ(HEX)は GM2-ガングリオシド(GM2)の加水分解酵素で、その活性低下によりライソゾーム内に GM2 が蓄積し細胞機能が障害される。HEX はその複合体形成の種類によって A 分画と B 分画の２つに分かれる。HEXA はα鎖(HEXα)とβ鎖(HEXβ)のヘテロダイマー、HEXB は HEXβのホモダイマーとして形成される。α鎖をコードする HEXα遺伝子の異常によるものは A 分画の活性のみ低下し Tay-Sachs 病と呼ばれ、β鎖をコードする HEXβ遺伝子の異常によるものは A、B 両分画の活性が低下し Sandhoff 病と呼ばれる。

患者は 15 歳時より下肢筋力低下を自覚、23 歳時階段昇降困難にて他院受診。筋電図その他より、進行の遅い ALS と診断された。35 歳時精査希望で本院を受診した。

２．方法と結果

2.1 酵素活性

まず患者の皮膚線維芽細胞を株化した。健常者および Tay-Sachs 病の線維芽細胞は理研のバンクより提供を受けた。別に健常者、患者、両親の末梢血より白血球を分離し、株化した線維芽細胞とともに酵素活性を測定した。活性測定にはヘキソサミニダーゼの人工基質である 4-methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (4MUG) を用いて測定した。さらに熱不活性法により A 活性、B 活性を分別測定した（表 1）。結果、総 Hex 値は健常者の約 12%に、HexA は約 15%、HexB は約７％に低下していた。また、ヘキソサミニダーゼ A に選択性のある人工基質である 4-methylumbelliferyl-7-(6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside) (4MUGS) をもちいて患者皮膚線維芽細胞のヘキソサミニダーゼ A 活性を測定し、健常者と Tay-Sachs 病の皮膚線維芽細胞でのヘキソサミニダーゼ A 活性と比較した。結果は健常者の約 20%の活性であった。さらに 4-MUG を用いて両親のヘキソサミニダーゼ活性を測定した。父親においては総活性値は健常者と同レベルであるのに対して B 活性の総活性に対する割合が 19%であり、健常者での 35±6%に比し低値であった。また母親では総活性、A、B 活性値いずれも健常者の約 1/3 であった。4-MUGS を用いた A 活性の測定でも、父親の活性が健常者と同レベルであったのに対し、母親では約半分であった。これらの結果から、保因者と考えられる父親と母親におけるヘキソサミニダーゼ活性の異常パターンが異なることを示していると考えられた。

表１　人工基質を用いたβ-グルコサミニダーゼ活性測定

	4-MUG(nmol/h/mg protein)					4-MUGS(nmol/h/mg protein)
	総 Hex	Hex A	Hex B	Hex A/total(%)	Hex B/total(%)	Hex A
A.白血球						
ｺﾝﾄﾛｰﾙ(n=145)	1401±320	905±209	496±161	65±6	35±6	220
患者	171	135	36	79	21	69
父	1763	1432	331	81	19	201
母	465	314	151	68	32	103
						Control:mean±SD
B.皮膚線維芽細胞						
コントロール	3900	2260	1640	58	42	390
患者	360	360	0	100	0	80
Tay-Sachs病	1880	60	1820	3	97	10

2.2 HEXB 遺伝子

インフォームドコンセントを得た後、患者と両親の DNA を白血球より抽出、HEXB 遺伝子のすべての exon と exon-intron junction を PCR で増幅したのち精製し、ABI377 シークエンサーによりシークエンスした（図１）。結果、患者には２つの新しい変異が存在した。一つは母親由来で Intron 2/exon 3 junction における G→A 置換(IVS2-1G>A)、他は父親由来で exon 13 における G→A 置換(R533H)であった。これに伴い 533 番目のアルギニンがヒスチジンに変換される。シークエンスの結果より、患者はいずれもこれまでに報告のない 2 つの新しい変異による compound heterozygote と証明された。

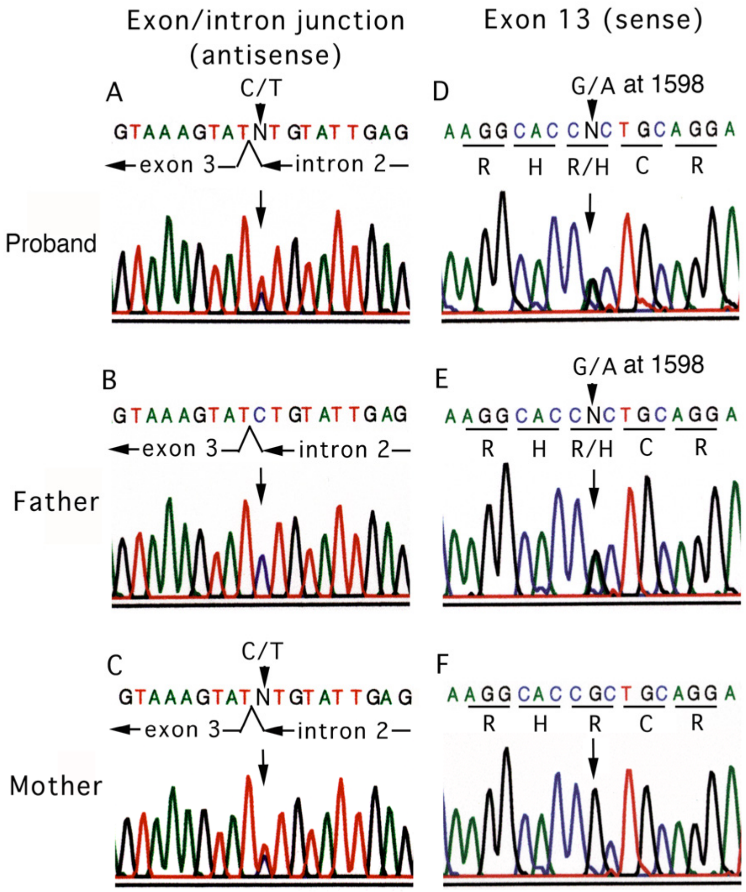


図１　新しい二つの変異を持つ HEXB 遺伝子のシークエンス

A-C はアンチセンス側の intron 2/exon 3 junction のシークエンス、D-F はセンス側の exon 13 を示す。

A、D:患者の HEXB 遺伝子

B、E:父親の HEXB 遺伝子

C、F:母親の HEXB 遺伝子

A は患者のアンチセンス側で C→T 置換した intron 2/exon 3 junction は HEXB 遺伝子のセンスで intron 2 の 3’-splice acceptor site の G→A 置換に相当する (IVS2-1G>A)。A と同じ変異が母親（C）にも確認されるが、父親（B）にはない。患者の HEXB 遺伝子（D）の exon 13 での c.1598G>A 置換の結果おこる R533H 変異は父親（E）にはあるが母親（F）にはない。このデータにより患者は二つの新しい変異を持つ compound heterozygote であることが判明した。

2.3 RT-PCR による IVS2-1G>A mRNA 解析

母親由来の変異酵素の mRNA の発現を見るために、患者より株化した線維芽細胞より RNA を抽出し RT-PCR を行い exon2 から 5 を増幅して解析した。健常者の cDNA では HEXβ鎖由来の 225bp のバンドを確認した。患者の cDNA からは二本のバンドが確認された。一つは正常でみられるバンドと同じサイズで、もう一つはそれより短いバンドだった（図 2A)。さらにそれらのフラグメントを pCR-Script Amp SK(＋)vector にクローニングしてシークエンスを確認した。患者の長いバンドは健常者の 225bp のバンドのシークエンスと同じものだった。短いバンドは 159bp のサイズで、これは exon 3 が欠失したものだった（図 2B）。図 2C は HEXB 遺伝子の exon 3 付近の構造を表す。G→A 置換によって intron 2 の 3' スプライス部位で異常が起き、結果 mRNA は exon 3 を欠失する不完全で短いβ-鎖を産出すると思われる。

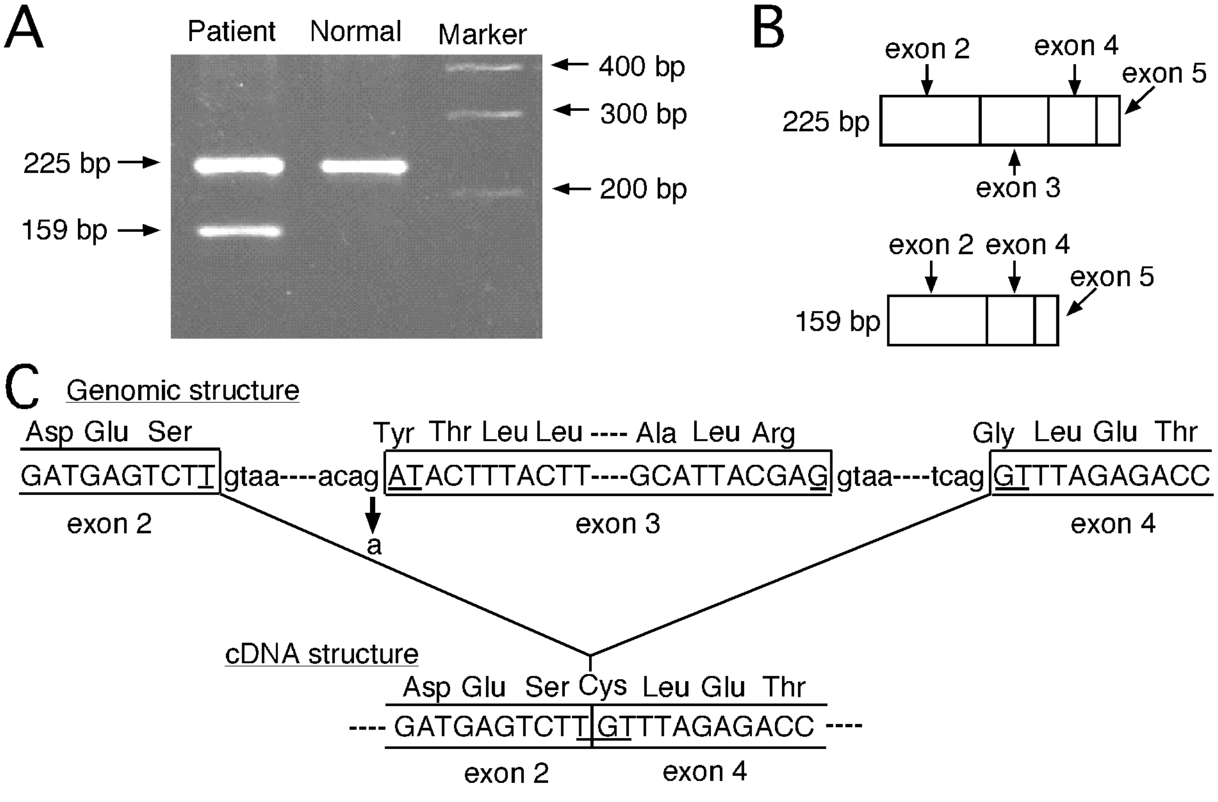


図 2　RT-PCR による患者とコントロールの皮膚線維芽細胞の HEXB の mRNA の解析

(A) PCR で exon 2 から exon 5 を増幅。健常者の皮膚線維芽細胞の cDNA からは 225bp のみ増幅される。一方患者の cDNA からは 225、159bp が増幅される。
(B) 患者の RT-PCR から増幅された二種類の DNA 断片。159bp の DNA 断片は exon 3 が欠損していた。
(C) exon 3 付近の HEXB 遺伝子の配列
G から A の置換を矢印で示す。この変異は intron 2 の 3'-splice acceptor site を無効にする。その結果 cDNA は exon 3 を失う。

2.4 RFLP による R533H の解析

患者と両親、日本人コントロール 100 人の exon 13 を PCR によって増幅し制限酵素 Fnu4H I で切断し RFLP 解析を行った。野生株の 200 アレルではすべて制限酵素 Fnu4H I で完全に切断され、225bp、181bp のバンドが確認された。患者と父親の変異株アレルでは 225bp、181bp のバンドの他に 406bp のバンドも確認された（図３B）。これは c.1598G>A の変異によって Fnu4H I 切断部位が欠失したことを示す。RFLP 解析は患者と父親の変異アレルが正常な多型ではなく、極めて稀な変異だということを示している。シークエンスの結果からも c.1598G>A の変異で Fnu4H I 切断部位の欠損が確認された（図３A）。

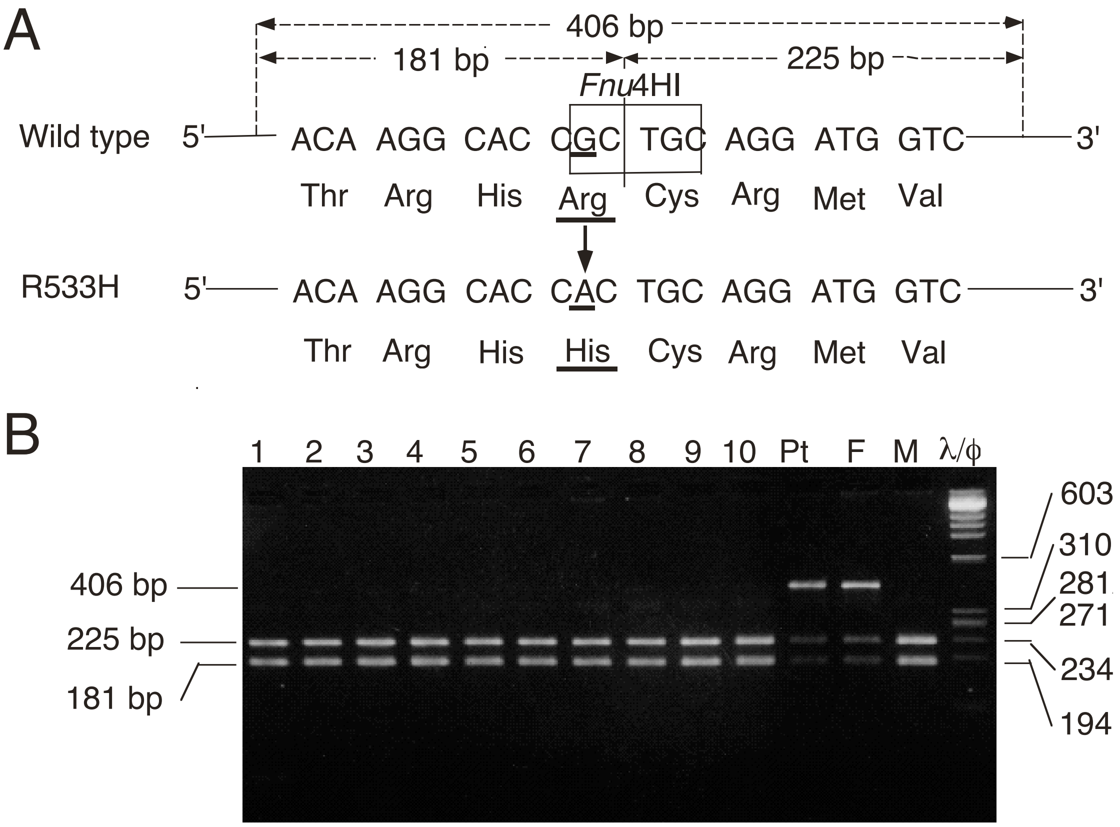


図 3　PCR-RFLP による R533H 変異をもたらした c.1598G>A 置換の解析

(A) 406bp の DNA 断片は、PCR によって Fnu4H I 制限酵素部位を持つ wild type より増幅される。c.1598G>A 置換による R533H 変異は Fnu4H I 部位が失われる。

(B) コントロール、患者、両親の PCR 断片を Fnu4H I で切断し解析した。患者と父親の 増幅された DNA の一ケ所が Fnu4H I で切断され、c.1598G>A 置換の heterozygous と確認された。コントロールの PCR 断片は Fnu4H I で完全に切断され、c.1598G>A 置換は日本人の中で共通に見られるような多型ではないことが示唆される。

３．考察

今回は過去に他院で ALS と診断されたケースを生化学的な検査で Sandhoff 病と正しく診断することができた症例である。またさらに遺伝子解析によって、従来報告のない新しい二つの compound heterozygote の変異も証明することができた。母親由来の intron 2 の 3'-splice acceptor site における G→A 置換の変異は exon 3 を欠失し、22 アミノ酸が欠けた短いβ鎖を作る。4-MUG、4-MUGS での酵素活性の測定が示すように、この不完全なβ鎖は酵素活性が失われていると考えられる。父親由来の exon 13 での G→A 置換の変異は 533 番のアミノ酸をアルギニンからヒスチジンにかえる。父親の総 HEX 活性は正常レベルだが HEXB の割合が低下していた。父親の酵素活性が人工基質にたいしては正常でも、生体内基質である GM2 ガングリオシドに対しては低下している可能性や、この R533H の変異は HEXB の熱耐性に関与している可能性も考えられる。

現在我々が測定しているライソゾーム酵素の異常症では、米国においてゴーシェ病とファブリー病で欠損した酵素そのものを補充することにより治療する酵素補充療法が可能となっており、日本への導入も間近である。Sandhoff 病では酵素補充療法の臨床応用には未だ到っていないが、今回のような診断は今後治療法が応用可能になった時点ですぐ治療への試みにつながる可能性が高いものと期待している。

謝辞

本研究において臨床医学系神経内科の吉澤利弘講師の御指導により、酵素活性測定および遺伝子解析の一部を担当致しました。深謝致します。

参考文献

[1] T. Yoshizawa, Y. Kohno, S. Nissato, S.Shoji, Compound heterozygosity with two novel mutations in the HEXB gene produces adult Sandhoff disease presenting as a motor neuron disease phenotype, J. Neurol. Sci. 159 (2002) 129-138.

[2] 河野豊, 吉澤利弘, 大越教夫, 玉岡晃, 庄司進一. 緩徐に進行する運動ニューロン疾患様症状を呈した成人型 Sandhoff 病の 1 例, 臨床神経学　41 (2000) 36-39.

ドライポンプのヘリウムタイト改良

○近藤裕、宮内幹雄、敦賀将太
筑波大学　人文・数理等教育研究支援室（低温センター）
〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

安価な空気用ドライポンプに気密性を高める改造を施すとヘリウムガス回収用送風機として使えるようになることがわかった。

１．はじめに

電気やガス、水道と同じように液化ヘリウムは極低温の研究と教育に欠かすことのできないものであるが、ヘリウムは大気中に殆ど含まれておらず、我が国に地下資源が無いため専ら米国からの輸入に頼っている。本学は資源の有効利用と経費の節約を目的に低温センターを中心とするリサイクルシステムを開学時に導入し、機器を更新しつつ今日に至るまで円滑に運用してきた。その概略を図１に示す。低温センターで液化されたヘリウムは小型容器で各研究室に供給され低温実験に用いられる。蒸発したヘリウムは各建物にあるサブセンターと呼ばれる設備のガスバッグに一時的に蓄えられ、後に共同溝にある回収配管を経由して送風機で低温センターに戻され、再び液化・供給される。ヘリウムガス回収用送風機にヘリウムガスの漏れがあってはならず、回収ガスに油蒸気が混入するのを避ける必要があるためヘリウムタイト型と呼ばれるヘリウムの気密性が保証されているもののうちで特に無給油式のものが用いられてきた。

図１に示すリサイクルシステムの送風機の吸入圧と吐出圧は共に殆ど１気圧であるが、上記の２つの条件に加えて要求される３０m^3／ｈ程度の風量を満足するものは値段が高く納期が長いため安価で入手容易な代替品の開発が望まれている。そこでヘリウムタイト以外は全ての条件を満たす空気用ドライポンプをヘリウムガス回収用送風機として用いるとどのような問題が発生するか、そしてどのような対策をすれば問題なく使えるようになるか調べることを研究の目的とした。

２．ドライポンプの構造と漏れの防止

図２に本研究に用いたオリオン機械株式会社製ドライポンプＫＲＸ６の構成図[1] を、図３にドライポンプの模式図を示す。モーターに直結された偏芯軸ロータがシリンダ内を回転するとロータに設けられた４本の溝からカーボンのブレードが飛び出し、シリンダとブレード、ロータの間に閉じた空間ができる。吸入口からその空間に引き込まれたガスはロータの回転と共に吐出口へと送り出される。すなわち、このポンプの構造は回転翼型真空ポンプから油を抜いたものにほぼ等しい。

モーターの回転数は 1450rpm(三相 200V、50Hz)で、設計風量は 34.5m^3/ｈ(同)である。

図１．ヘリウムの流れ

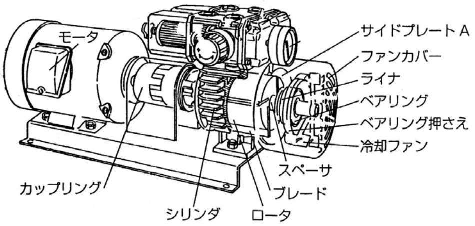


図２．オリオンドライポンプ構成図

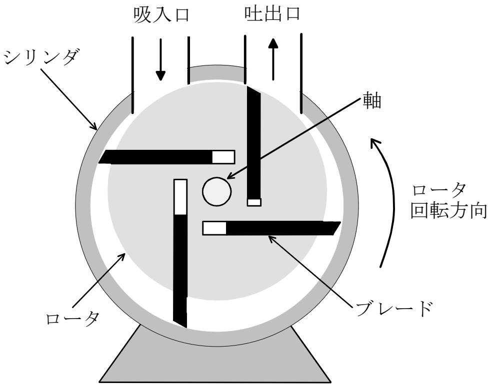


図３．ドライポンプの模式図

このポンプは空気用のため送風性能に影響を与える吸入口と吐出口周辺以外の気密性は殆ど考慮されていないようで、ヘリウムガスでテストを行ったところ小型ヘリウムガス漏れ検知器(BOC Edwards 社製ガスチェック 3000)で測定可能な最大漏れレートである１x１０$^{-1}$ml/sec を大きく上回る漏れが軸受部から見つかった。このままではヘリウムガス回収用には漏れが多すぎるので漏れの場所を特定して対策を検討するためにドライポンプを分解した。使われていた軸受は深溝玉軸受非接触シールド型ベアリング(6205ZZ)であった。非接触シールド型(ZZ 型)とは金属のシールド板を外輪に固定し、内輪シール面に設けられた V 字溝との間でラビリンスすきまを形成して異物の侵入を防ぐものであり、このすきまを通ってヘリウムガスが多量に漏洩していることがわかった。内輪と軸は締まりばめになっていたが、直径５２mm の外輪とハウジングとの間は半径で約 0.01mm のすきまがあるすきまばめで、ここも漏れの発生源になっていた。

ヘリウムガス回収用送風機として使うには内外輪間および外輪とハウジングの間を気密にする必要があるので 6205ZZ の代わりに図４に示す NTN 株式会社製ＡＣ軸受け接触シール型ベアリング(6205LLU)を検討した。図５にその断面図[2]を示す。接触シール型(LLU 型)とは鋼板に合成ゴムを固着したシール板を外輪に固定し、シールの先端が内輪シール面の V 字溝側面に接触しているもので防塵性のみならず防水性にも優れている。気密性までは考えられていないが使用される吸入圧と吐出圧から内外輪間の漏れが止まることが期待できる。LLU 型は合成ゴムが V 字溝側面を摺動しているため ZZ 型と比べて回転速度と使用温度に対する制限は厳しいが、6205LLU の許容回転速度は 8900rpm で[3]モーターの回転数を約６倍も上回っていること、そして運転時間が１回約３０分間、１日あたり多くて５回程度の間けつ運転であることから温度上昇が少なく比較的長期間の使用に耐える可能性がある。LLU 型はベアリングの両側が接触シールされていて、シールされた内側のボール周辺に潤滑用グリスが塗布されている。したがって全くのオイルフリーとは言い難いが接触シールされていることもあり実用上問題ないと判断した。

ＡＣ軸受とは、主要寸法は通常のベアリングと同じで外輪外径に２本の溝を設けＯリングを装着したものである[4]。これらは外輪とハウジングがすきまばめのときＯリングですきまを埋めて共回りとクリープを防止するものだが、外輪とハウジングの間からの漏れを防止できると考えた。

上記の検討結果から、このドライポンプの軸受けを AC6205LLU にすればヘリウムガス回収に使えるようになる可能性が高いので実際に交換して検証することにした。

図４．AC 軸受接触シール型ベアリング

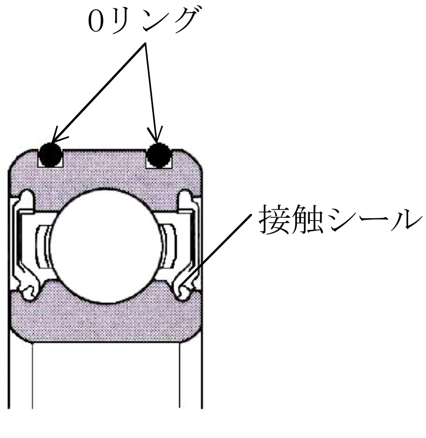


図５．ＡＣ軸受け接触シール型ベアリング断面図

３．作業方法

次にベアリングの交換手順について説明する。取り外し手順は以下の通りである。ドライポンプをベースから取り外す(図６)。ファンカバー、冷却ファンを取り外す(図７，８)。ベアリング押さえを外すとベアリングが見える(図９)。ベアリング押さえには紙のスペーサーが組み込まれている。これはドライポンプの温度が上昇してロータが熱膨張しても適切な位置を維持させる役割があるので無くしたり組み合わせを変えたりしてはならない。サイドプレートＡとシリンダの接合ボルトを取り外し、シリンダからサイドプレートＡを離す。シールを兼ねた接着剤で接合されているので３カ所の爪に棒などを当て均等に叩いて離す(図１０，１１)。サイドプレートＡのハウジングにギヤプーラーをかけハウジングと共にベアリングを軸から外す(図１２)。ハウジングからベアリ

ングとライナを抜き取る(図１３)。ハウジングに対してベアリングはすきまばめであるから手で引っ張れば抜ける。ロータ内のカーボンのブレード４枚を取り出す(図１４)。モーター側のベアリングを取り出すには、軸のカップリングのイモねじを緩め取り外し、ベアリング押さえを外す。ハウジングにギヤプーラーをかけ、ロータと一体になっている軸をギヤプーラーのネジで押すとロータを取り出すことができる(図１５)。シリンダのモーター側にあるサイドプレートは外す必要はない。最後にベアリングをハウジングから抜き出し、分解は終了する。図１６に取り外した全ての部品を示す。

組み立て手順は以下の通りである。シリンダにロータとブレードを挿入する(図１７)。サイドプレートＡのシリンダ接合部全面にシリコンシーラントを塗りシリンダにボルトで固定する(図１８)。シリコンシーラントがシリンダ内にはみ出さないように注意する。作業台にポンプを置く(図１９)。ハウジングにライナを入れ、AC6205LLU ベアリングを挿入する。ベアリングが斜めにならないように注意しながら内輪に当てたパイプをハンマーで叩き挿入する(図２０)。紙のスペーサーとベアリング押さえを取り付ける。もう一方のベアリングを同じ要領ではめ込む。軸と内輪は締まりばめになっているが、僅かでも漏れを減らすため嵌合部にシリコンシーラントを盛りつける。シリコンシーラントが乾燥したらベアリング押さえを取り付ける(図２１)。

ドライポンプ本体が組み上がったらベースにモーターと同軸になるようにポンプを固定し、カップリングで結合する。冷却ファン、ファンカバーを取り付けてベアリングの交換作業は完了する。

図６．ドライポンプをベースから取り外す

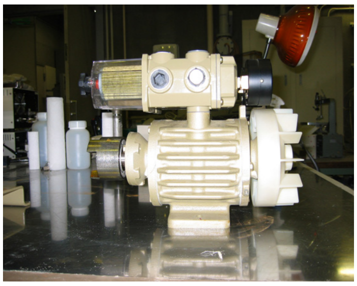


図７．ファンカバー取り外し

図８．冷却ファン取り外し

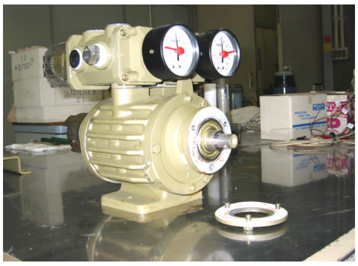


図９．ベアリング押さえを外す

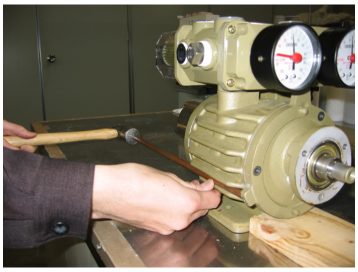


図１０．爪に棒などを当て叩く

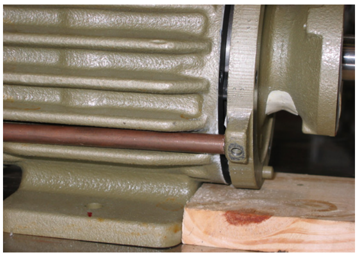


図１１．シリンダからサイドプレートＡを離す

図１２．ギヤプーラーをかけベアリングを外す

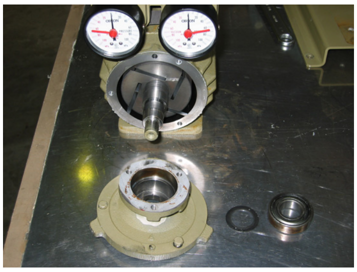


図１３．ベアリングとライナの抜き取り

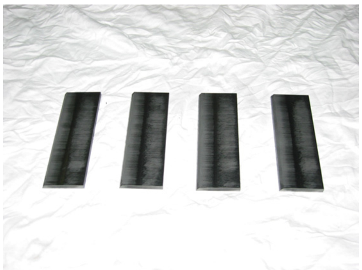


図１４．取り出したカーボンのブレード

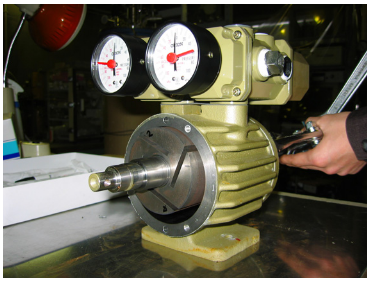


図１５．モーター側ベアリングの取り出し

図１６．分解したドライポンプ

図１７．シリンダにロータとブレードを挿入

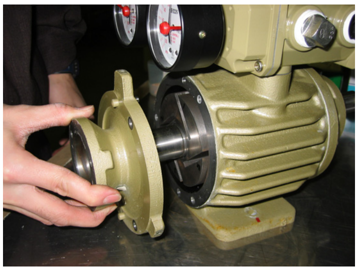


図１８．サイドプレートＡをシリンダに固定

図１９．作業台にポンプを置く

図２０．AC6205LLU ベアリングの挿入

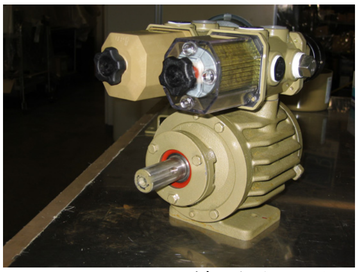


図２１．ベアリング押さえの取り付け

４．結果と検討

ドライポンプにヘリウムガスボンベを接続して漏れテストを行った。本学のヘリウムガス回収用送風機は大気圧のガスバッグから吸入して低温センターへ２インチ回収配管でヘリウムガスを送る。したがって吸入圧と吐出圧は共に大気圧と大差ないので０.０１ＭＰａ(ゲージ圧)で調べた。運転中と停止中の漏れ量はともに小型ヘリウムガス漏れ検知器で検知可能な２x１０$^{-5}$ml/ sec 未満であった[5]。写真２２に示すように改良したドライポンプを一つのサブセンターに設置して試用したところ、ヘリウム回収率すなわち(液体換算の回収量)／(液体ヘリウム供給量)は９０％以上(ヘリウムトランスファー時の漏洩などユーザーによる各実験室内での損失を含む)となりヘリウムガス回収用送風機として使えることがわかった。

今回の改良が成功したのは運転中、停止中ともにドライポンプ内の気圧と大気圧との差が殆どなく、しかも連続運転しないという好条件に助けられたからであると我々は考えている。使用したドライポンプ自体は真空排気からゲージ圧６０ｋＰａの加圧まで可能だが、ポンプの内外で気圧がかなり異なる使用条件では別の対策が必要になると予想している。圧力差に加えて長時間連続運転する、環境温度が高い、あるいは吐出圧が高いなどポンプの温度が上昇する条件下ではシールに対する要求は更に厳しくなるであろう。

ヘリウムガス回収に使用すると何時間程度の運転で接触シール部から漏れが発生するか、そして液体ヘリウム減圧用をはじめとする他の用途に使うとどのような問題が発生するか今後調べていく予定である。

図２２ ．設置したドライポンプ

謝辞

本報告にあたり、ご指導ならびにご助言を頂いた低温センター長 瀧田宏樹教授、吉崎亮造教授、池田博講師、ベアリングに関する情報を頂いた古谷野有講師に感謝いたします。

参考文献

[1] オリオン機械株式会社 「オリオンドライポンプ取扱説明書」
[2] NTN 株式会社 「転がり軸受け総合カタログ」(CAT.NO. 2202-IV/J), B-5
[3] NTN 株式会社 「転がり軸受け総合カタログ」(CAT.NO. 2202-IV/J), B-10
[4] NTN 株式会社 「転がり軸受け総合カタログ」(CAT.NO. 2202-IV/J), B-7
[5] BOC Edwards 社 「ガスチェック 3000/3000is 取扱説明書」

美術領域における技術的スキルアップのためのアルミ鋳造スタディ

林剛人丸[1]、
筑波大学 人間総合等教育研究支援室（芸術学系工房）
〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

美術の領域においては、技術とは作者に内在する主題を外に表現として取り出す術として不可欠な要素である。具体的目的を伴ったアルミニウム鋳造のスタディを通して、表現に際して希求される技術まで辿り着くモデルを示すねらいでワークショップを開催した。

１．はじめに

芸術学系工房では、希望する学生を対象として不定期にワークショップを開催している。ここ数年来では「アーク溶接」「木材加工機械の操作」「シルバー素材のジュエリー制作」などを題材として取りあげた。これらは授業カリキュラムとは別に企画されており、単純な技術修得に陥ることなく、例えば大規模な機械施設に頼りきらないなど、各自の制作に将来的にもフィードバックできる技術の指導を心掛けている。

今回は昨年度の技術発表に続いて、アルミニウム合金を材料とする鋳造のスタディについて報告する。そもそものきっかけは、フルモールド法による鋳造を行った際に、一人の学生が「鋳造物の表面を滑らかに仕上げたい」との思いから改良を試みたことによる。フルモールド法では鋳造物の表面に砂のテクスチャーが形成されるので、原型（フルモールド法においては発泡材による消失模型）に石膏を塗布して原型と砂の間に層をつくるというコンセプトだった。結果的には、鋳込みの段階で水蒸気が発生して原型が砂を撃ち破って吹き出してしまう事態となり失敗に終わるものの、試みを失敗で終わらせてしまうことなくチャンスととらえて新しい技法に挑戦したいと考えた。

２．改善要件

最初に学生達とこれまで行ってきたフルモールド法による鋳造の経験から改善したい事項を挙げ、類別しながらまとめる作業を行った。

2.1 砂かみ現象

主に、鋳造物の表面付近に形成され、原型本来の形よりも余分に金属が飛び出して面状あるいは放射状に突起し砂と絡まってしまう。あるいは鋳造物表面に食い込むような状態で砂が内部に入り込んでしまうこともある。

前者だと削り取ることは可能であるが、かなりの作業量であるし、表面の表現を損なってしまいかねない。

2.2 表面のざらつき

フルモールド法では、鋳造物が直に砂に触れている状態であるために、原型のテクスチュアではなく砂の粒子のテクスチャーが鋳肌を形成する。原型となる消失模型を製作する際には、発泡スチレンを８００番ほどの耐水ペーパーで研摩する等、表面にも留意して製作するが、鋳造物には反映されにくい。

また金属光沢を得るためには表面を削った後に研摩するが、形体を慎重に吟味してつくってもプロポーションが変わってしまうことにすらなりかねない。これらは鋳造ならではの複雑に入りくんだ形体の表現の妨げにもなってしまう。

2.3 巣

金属は、溶解中にガスを吸収し凝固時に放出する。その際に放出しきれずに鋳造体に残った小さな気孔をガス巣やブローホールという。アルミニウムを溶解した時には、水素の吸収が顕著であり、ガス巣の生成要因となっている。

ガス巣は鋳造物の表面だけでなく中にもあるので、研摩しても完全に除去することができない。多いと胡麻粒がついているように見え、光度も上がらない。

時に収縮によるひけ巣も見られ、その表面の荒れはガス巣よりも大きく、表現を損なう原因となっている。

2.4 酸化物

溶解したアルミニウムは表面に酸化膜を形成する。酸化膜は除去してもすぐに新たな膜が生成され、これが溶湯に巻き込まれて鋳型内に注ぎ込まれて不良の原因となる場合がしばしばある。

また、酸化物はガス巣やひけ巣を誘発するので可能な限り排除したい事項である。

2.5 欠陥

回を重ねる度に減少した失敗だが、湯まわりが悪く完全な鋳造体ができないことがある。数は少ないが、砂の崩壊によって鋳型が崩壊して起こる場合や、湯口やガス抜き口の取り付け位置のせいで溶湯を充てんできないといった失敗も起こっていた。

[1] E-mail: goj@geijutsu.tsukuba.ac.jp

３．スタディプラン

2.1-2.5 の改善要件を受けて、ディスカッションしながらどのような技法や材料を選択するかプランを企てていった。

3.1 鋳型

砂を用いずに、耐火石膏を用いた石膏型を採用した。砂の粒子を細かいものにすることや、塗型と呼ばれる表面保護材を塗布することも考えられたが、貴金属の精密鋳造にも使用する耐火石膏を用いることで、鋳造物における原型の再現性をできるだけ高度に達成することを志向した選択を採った。

型枠には鉄製の缶の底部を切り取って筒状にしたものを流用して、枠ごと焼成する。

耐火レンガやコンクリートブロックで仮設のカマをつくり、一般的な木炭を用いて自然通気で燃焼させ、焼成温度をコントロールする。木炭は自然通気での燃焼の場合おおよそ８００℃の温度となるので、耐火石膏の焼成温度として適している。

3.2 原型

発泡ポリスチレンを整形したものにはワックスなどで表面処理を施し（パテ処理）、原形の表面に気孔がないようにする。そのほかに蝋を用いた原型や、スチロール樹脂など発砲させていない合成樹脂を用いた原型も当然、石膏型に有効であろうと判断した。

また、天然物（植物や昆虫など）をそのまま原形に用いたものを８００℃で焼成すると、ほぼ灰だけになり体積としてはごく微量になるから、石膏型内に空間を確保できると予想し、実験的に採用した。（ただし焼成時間設定についてのデータは無し。）

3.3 加圧

欠陥の抑止ために、鋳造工場では溶湯に圧力をかけて注入することや、原型内を減圧して溶湯を引き込むことが一般的に行われている。

今回のスタディにおいては、細部の表現性を高める意味でも、原型内に溶湯が充満するのを助長する仕組みが欲しいと考え、鋳込んだ後に溶湯を水蒸気で加圧することを試みた。鋳型の枠上部をすっぽり被えるような蓋を作成し、内部に綿布を貼って水をしみ込ませておく。溶湯を注ぎ終えた後、素早くこの蓋をして、熱で発生した水蒸気によって圧迫する。

同様の手法は「圧迫鋳造」として、貴金属の鋳造等の小さな規模の鋳造に用いられている。

3.4 酸化物

溶解の後、ほう砂を添加してから炭素棒で撹拌し、溶湯中の酸化物を溶湯表面に浮き上がらせ取り除き、巻き込みによる不良を避ける。

工業用のフラックスを用いることも考えられたが、出荷単位が大きいなど個人では入手しにくいことから今回は採用せず、入手しやすいほう砂を採用した。

3.5 ガス放出

ガス巣の原因である溶湯に含有される水素を外気に放出するために、食塩を適量添加することとした。化学反応により、水素は塩素ガスとして溶湯より放出される。塩素ガスは有害だが、屋外空間で溶融も少量（約３０kg）であるため、直接吸い込まないように留意するにとどめた。

４．実制作報告

当日は９名の学生が参加して行われた。以下、順を追って実際の制作工程を紹介する。

4.1 原形制作

粘土やワックス等で湯道と湯口をつくり、接合する。湯口は椀状につくり、そこに溜まった溶湯が重力によって押し湯となるようにする。

図 1
ワックスでつくった原型に湯口、湯道をとりつけている。

図 2
しめじをそのまま原型として用いた作例。

4.2 鋳型制作

原形となるものが合成樹脂やワックス等の場合、埋没させる石膏との親和性が全くないため、界面活性材を塗布する。両者がなじみやすくなるため、両者の乖離や空気の巻込みを防止できる。

耐火石膏は歯科技工用と同等のものを使用した。

図 3
界面活性材を表面に筆で塗布する。

図 4
原型を壊さないように石膏を注入してゆく。

4.3 焼成

コンクリートブロック等で囲いをつくり、徐々に温度を上昇させる。はじめは薪を少しだけ燃やして、段階的に増やし、1 時間ほどで炭の火力に切り替わるようにした。さらに 1 時間ほど後に蓋をして閉ざし、2 時間半火力を維持した。

図 5, 6, 7
火力を調整して温度を管理しながら焼成する。

4.4 溶解・鋳込み

溶解にあたっては、前述の通りほう砂と食塩を用いた。何も用いずに酸化物を除去していた時に比べて、排出される酸化物が多く感じられた。

一方で、溶解を始めるタイミングが早すぎ、溶湯が高温になりすぎたようである。また、溶湯のまま保持する時間が長くなるため、酸化物や含有ガスが多く発生する原因をつくってしまったことになる。

また、カマから取り出す際に損傷してしまった可能性のある鋳型も多くあり、食品用の缶を流用したものでは型枠が弱すぎることも確認された。

図 8
溶解したアルミニウム合金に食塩を添加する。

図 9
注ぎはじめは、木の棒で酸化幕を切る。不純物が混入しないように、棒は先端を燃やして炭化させたものを使う。

4.5 加圧

あらかじめ製作しておいた圧迫蓋を用いて水蒸気で加圧する。凝固が終わるまで保持しないと効果がないので、しばらく蓋をしたまま押さえ込む。

図 10
加圧の様子。溶湯が下にこぼれだしている。

4.6 割り出し

鋳込んだ後に、凝固するのを待って水で急冷する。石膏が崩壊して、鋳造物を取り出すことができる。

図 11, 12
急冷した後、やっとこでつかんで取り出す。

5. まとめ

今回トライしたほとんどの鋳造物には欠陥が見られ、総合的に満足のいく結果を得ることはできなかった。しかし、部分的にはディティエールの再現に成功しており、良好な鋳肌を得る目的に重要なヒントと経験を得た。ワークショップ自体はスキルアップを最大の目標としているのだから、スタディの意義は十分にあったであろう。

3.1-5 で取り上げた事項はどれも一定の成果を挙げたと考えられる一方、鋳型の損傷、焼成時間の不足、溶湯温度の過度の上昇といった問題が浮上した。早速、鋳込み作業後のディスカッションにより

- 鋳型を強固なものにすること。（堅牢な素材の型枠制作）
- 燃焼時間をもっと長くとること。（のぼり釜型のカマの制作もしくは電気釜の使用）
- 溶湯の温度管理をはかること。（溶解開始のタイミングの調整）

との改善点があげられた。続くワークショップを企画中であるが、このような話し合いが主体的になされたことこそ、今回のスタディの最大の成果と言うべきであろう。

６．作例

作例 1

発泡スチレンを原型に用いた作品。
欠陥はないが、左上部に見られる面状のバリは鋳型の石膏に亀裂ができたことを示している。

作例 2

ポリウレタンを原型に用いた作品。
欠陥部分には、原型が炭化したものが入り込んでおり、原型が燃焼するためには焼成時間が短かすぎたことをうかがわせる。

作例３

しめじをそのまま原型に用いた作品。
欠陥部分にはあるものの、部分的に細部の表現に成功しており、今後の可能性を示唆している。

作例 3 部分

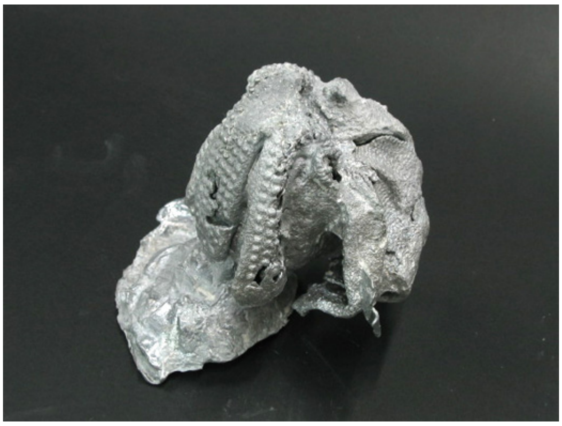
作例 4

生花を原型に用いた作品。
肉厚の花を選択したものの湯まわりしなかったと考えられる。花びらの部分の端部は丸みをもったまま凝固しており、圧力が不足したと推測される。

作例 5

生のぶどうと発泡スチレン製のトレーを原型に用いた作品。
右側にある黒い粒はアルミニウムが鋳造されたものではなく、原型が炭化したものである。この例からも焼成時間の不足が推測される。

作例 6
発泡スチレンを原型に用いた作品。表面の比較的大きな凹凸の荒れはひけ巣の現象としては激しいので、スチレンの気化・膨張による鋳型の損傷の可能性がある。



作例 7
ゴムの突起付き軍手を原型に用いた作品。比較的再現に成功しているが、これにも炭化した原型が部分的に残存していた。

作例 8
スチロール樹脂を原型に用いた作品。欠損している部分を観察すると下部から上ってきた様子があり、湯道の位置、数、バランスに問題があったことを示している。
　同時にスズメバチを原型として用いたものも鋳造したが、鋳込まれていなかった。湯道との接合に問題があったものと推測される。

病気の原因となる細胞やタンパクの局在を検索するための
免疫二重染色法について

磯山茂美
筑波大学人間総合等教育研究支援室（医学系）
〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

免疫染色法は分子レベルで病理組織の検索を可能にする点で、きわめて重要な技術である。今回私が検討した免疫二重染色法は、組織切片上で複数の分子の局在を同定できるので、特に有用性が高い。目標とする分子（抗原）の存在を可視化するためには、検出に用いる抗体を、酵素または蛍光物質で標識する必要がある。前者は酵素抗体法、後者が蛍光抗体法である。本研究では、免疫二重染色について、酵素抗体法と蛍光抗体法の長所と短所を検討した。

酵素抗体法では至適条件の設定に時間を要するが、組織全体の把握に優れていた。一方、蛍光抗体法は染色条件の設定が容易であり、また共焦点レーザー顕微鏡を用いることにより、細胞内の微少器官レベルで抗原の局在を精密に決定することが可能であった。

１．はじめに

病気の原因を知るために、ある特定の細胞やタンパク質が体内のどこに存在するか検索することは重要である。小児科研究室では病的タンパクの存在部位を病理組織学的に検討することで、先天性疾患の診断に役立てている。

免疫染色法とは、免疫（抗原-抗体）反応を利用して、特定の物質（抗原）の存在部位を明らかにする方法である。実際には組織切片に抗体をかけて抗原と結合した抗体の存在部位を染め出し、顕微鏡で観察する。この方法により、分子レベルで組織切片の観察が可能になる。

抗体を目で見えるようにするために、種々の物質で標識された抗体を使用する。ペルオキシターゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素で標識された抗体を用いて、光学顕微鏡により明視野で観察する方法を酵素抗体法と呼ぶ。蛍光物質で標識された抗体を用いて蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡などで観察する方法は蛍光抗体法である。重金属で標識すれば、電子顕微鏡による観察も可能である。

さらに同一切片上で複数の物質を同定する場合に多重免疫染色法が用いられる。この場合には異なる標識物質や、酵素反応の基質を変えることによって、２種類以上の抗体を識別し、複数の目的物質の存在部位を染め分けることが可能になる。技術的な制約から二重染色法が多用されている。

２．目的

光学顕微鏡レベルで免疫二重染色を行う方法として、通常の光学顕微鏡で観察する酵素抗体法と、蛍光顕微鏡で観察する蛍光抗体法がある。本研究では、この両者を行い、その長所、短所を検討したので報告する。

３．方法

酵素抗体法（二重染色）

パラフィン切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシターゼのブロッキングを行い、一次抗体を反応させた。洗浄後、ペルオキシターゼで標識された二次抗体を反応させた後、ニッケル-ジアミノベンジジン（DAB）で発色させた（１回目の染色、青色に発色）。さらに別の抗原を検出するために、異なる特異性を有する一次抗体、二次抗体と反応させ、DAB で発色させた（二回目の染色、茶色に発色）。封入後、顕微鏡で観察した。

蛍光抗体法（二重染色）

パラフィン切片または凍結切片を用い、二種類の異なる動物種由来の抗体を混合した一次抗体と反応させた。洗浄後、Cy3、Alexa488 等で蛍光標識された二次抗体を混合して反応させた。洗浄後封入し、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

免疫染色法における条件設定には、まず陽性、陰性コントロールを用意して、内因性ペルオキシターゼのブロッキング法や抗原賦活化法の選択、一次抗体の希釈倍率、二次抗体の特異性の検討を行った。さらに種々の切片を用いて、酵素抗体法と蛍光抗体法の違いを検討した。

３．結果と考察

染色法についての検討

酵素抗体法では、

1. 内因性ペルオキシターゼをブロッキングするために過酸化水素の濃度や反応時間を変えて検討する必要があった。
2. パラフィン切片では、しばしば抗原性が低下しており、このため抗原の賦活化が必要な場合が多かった。抗原賦活化法には、マイクロウエーブ処理とプロテアーゼ K 処理を用いた。一次抗体の種類ごとにどちらが適切か検討し、さらにその至適条件を決めるために、マイクロウエーブの温度や時間、プロテアーゼ K の温度、反応時間を細かく検討する必要があった。しかもこの条件設定は、標本ごとに変える必要があった。
3. 一次抗体の濃度は、陽性コントロールと陰性コントロールを見比べながら、細かく検討し

た。
一方、蛍光抗体法では１は不用で、２ではマイクロウエーブ処理のみが可能で、検討項目が少なく、３の一次抗体の希釈濃度も、細かく検討する必要がなかった。

顕微鏡観察での検討

酵素抗体法では、通常の明視野下での観察が可能であり、組織の構築の全体像が容易に把握できた。さらに対比染色を行えば、説得力の高い像が得られた。また、標本は長期間保存が可能であった。

蛍光抗体法では、見慣れていないと、組織の全体像の把握が困難であった。しかし、抗原の局在を精密に決定することが可能であった。特に、コンピューターを用いて異なるフィルターで撮影した写真を重ね合わせることにより、二種類の抗原が同じ場所に存在するのか、異なる場所に存在するのか明瞭に示すことができた。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いれば、細胞内の微小器官のレベルで、抗原の局在を決定することが可能であった。

以上から、酵素抗体法は組織レベルでの観察に、蛍光抗体法は細胞レベルでの観察に有用な免疫二重染色法であることが判明した。

参考文献

[1] 組織細胞化学、日本組織細胞化学会編
[2] R. Sumazaki, N. Shiojiri, S. Isoyama et al., Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. Nature Genetics 36 (2004) 83-87.

ELISA 法による *Staphylococcus aureus* に対するヒト血清中抗体の測定

櫻井秀子
筑波大学人間総合等教育研究支援室（医学系）
〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

腎臓内科研究室において IgA 腎症の原因について研究支援を行っている。今回は血清中の抗体を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法を用いて測定した。

IgA 腎症は、腎糸球体メサンギウムに IgA, 特に IgA1 を中心とする免疫複合体の沈着があり、暖徐に進行する慢性糸球体腎炎である。常在菌叢である *Staphylococcus aureus (S. aureus)* に注目し、Western blotting 法を用いて S. aureus 膜抗原と IgA 腎症患者血清中の抗体を解析し、17KDa 及び 35KDa の蛋白と反応する抗体が、患者血清にしばしば存在することが判明した。*S. aureus* 由来の protein A を吸収した抗原を用いた ELISA 法を開発した。IgA 腎症患者の多くは、*S. aureus* 膜抗原に対して高応答性であり、IgA の subclass では IgA1 が主として反応することが明らかになった。

１．はじめに

IgA 腎症は腎生検の所見で腎糸球体メサンギウムに IgA、特に IgA1 を中心とする免疫複合体の沈着があり、慢性に経過する腎疾患である。わが国をはじめ、世界中で最も頻度の高い慢性糸球体腎炎で、30～40%の患者は 20～30 年の長期経過で腎不全に至ると言われており、わが国では維持透析を受けている患者の原疾患では最も多い疾患である。この IgA 腎症の発症機序は不明であり、治療法も未だ確立していない。 発症の引き金となる抗原は、特定が難しく、細菌抗原、ウイルス抗原、食物抗原、自己抗原などの報告はあるが IgA 腎症のほとんどは証明されていないのが現状です[1]。

当研究室では黄色ブドウ球菌 *S. aureus* 感染後に発症する、ネフローゼ症候群を呈し、急速に進行する腎炎で、主に腎糸球体メサンギウムに IgA の沈着を認めることから、IgA 腎症関連腎炎であることを報告した[2]。

従来から IgA 腎症患者では上気道炎、扁桃炎を有することが多く、扁桃摘出術が有効であることが報告されている。 IgA 腎症患者で上気道の常在菌である *Hemophilus parainfluenza* の菌体成分の沈着を糸球体に証明した報告がある[3]。

S. aureus が IgA 腎症の成因原因の一つではないかと検討を行った。ELISA 法により血清中の *S. aureus* に対する抗体を測定し、他の腎疾患との比較を行ったので報告する。本疾患惹起抗原として、上気道粘膜の常在菌である *S. aureus* 膜抗原に着目し、患者の血清を用いて、Western Blotting 法をにて患者の血清中の抗体の性状を検討し、*S. aureus* 由来の Proten A を吸収した抗原を用いた ELISA 法を開発した。

２．材料及び方法

2.1 抗体測定用血清

筑波大学付属病院腎臓内科入院患者内訳
IgA 腎症 (IgAN) n=94
MRSA 関連腎炎 (post MRSA GN) n=29,
紫斑病性腎炎 (HSPGN) n=4,
膜性腎症 (MN) n=27
膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN) n=8
ループス腎炎 (LN) n=39,
半月体形成腎炎 (Pauci Cr GN) n=19,
非 IgA 型腎症 (non-IgAN) n=7
微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) n=11
巣状糸球体硬化症 (FGS) n=15
微小変化群 (Minor) n=17
尿細管間質性腎炎 (TIN) n=6
良性腎硬化症 (BNS) n=14
正常人 (Nomal) n=16、以上の血清を用いた。

2. 2 *S. aureus* 標準株 8325 の膜蛋白調整

S. aureus を BHI 培地 (Brin Heart Infusion) (DIFCO) を用いて 37℃16 時間振震培養して、遠心にて集めた *S. aureus* を TE buffer(10mM Tris Hcl, 1mM EDTA pH 8.0)に浮遊させて lysostaphin （和光純薬）を用いて 37 ℃ 45 分反応させ *S. aureus* を溶菌させた。 超遠心と超音波、CAPS により *S. aureus* の粗分画を得た。さらにヒト IgG を結合させ sepharose 4B (Amersham Bio)にて *S. aureus* 由来の protein A を吸収した精製抗原を得た。*S. aureus* 抗原は Western blotting 法により、protein A の存在の有無を確認し ELISA 用抗原とした。

2. 3 Western blotting 法

S. aureus 膜蛋白は 12.5 % SDS-PAGE (SDS-ポリアリルアミド電気泳動) 後，PVDF 膜 (polyvinlidene fluoride) (Millpore) 25V、1 時間電気的に転写した。5 % スキムミルク加 TBS でブロッキングを行い、PVDF 膜を種々の抗体、IgA 腎症血清、二次抗体にペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG (rabbit), ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgA (rabbit) (DAKO)、その他ペルオキシダーゼ標識抗 protein A 抗体 (IMS)も反応させ、ECLpuls (Amersham Bio)で発光させフィルムに露光した。

2. 4 ELSA 法

精製した *S. aureus* 膜蛋白を coating buffer (20mM Sodium Carbnate Buffer pH9.8) で希釈して 96 穴の ELISA 用プレート (Costar) に一晩コーティングした。 0.5 % BSA 0.05 % Tween PBS (T - PBS) で特異的な吸着をブロックした後に、T - PBS 洗浄後 100 倍希釈血清を加え 1 時間反応、T - PBS 洗浄後, 希釈ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG (rabbit)
ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgA (rabbit) (DAKO)、1 時間反応後、T – PBS で洗浄する。 基質 ABTS 2,2-azaino-di(3-ethylbenzthiazoline) sulfonic acid を加え、15 分後に 2mM 窒化ナトリウム加え反応を停止し、イムノリーダー (405nm) で測定した。
S.aureus 膜蛋白に対する IgA のサブクラスの測定は抗ヒト IgA1 , IgA2 (mouse) (Nordic Imunological Labratoris)を用い、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG (rabbit) (ZIMED) を用いた。

2. 5 統計解析

Analysis of variance (ANOVA) を用い、$P < 0.05$ を有意とした。

３. 結果

3. 1 *S. aureus* の膜蛋白の性状の検討

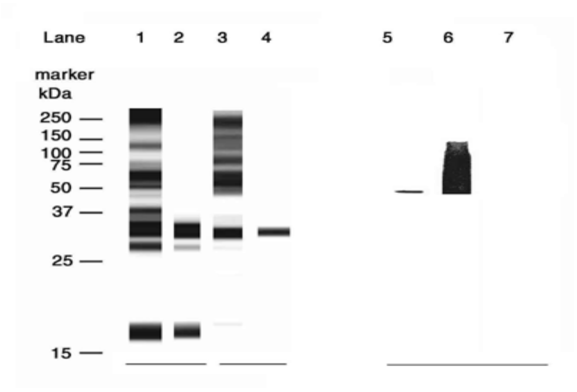


図１ *S. aureus* の膜成分の Western blot 法
lane1. 3 crude membrane *S. aureus*
lane 2. 4 protein A 吸収 membrane *S. aureus*
lane 1. 2 第一抗体 IgAN 患者血清
第二抗体 HRP 抗ヒト IgG
lane 3. 4 第一抗体 IgAN 患者血清
第二抗体 HRP 抗ヒト IgA
lane 5 protein A
lane 6 crude membrane *S. aureus*
lane 7 protein A 吸収 membrane *S. aureus*
lane 5. 6. 7 HRP 抗 protein A (chicken)

Lane 1 及び lane 3 に *S. aureus* 粗膜成分を加え、患者血清で染色すると多数のバンドが検出された。一方、ヒト IgG 結合 Sepharose 4B で protein A 吸収の膜成分、(ELISA 用抗原) のバンドは主に 35kDa と 17kDa の２本であった。ELISA 用抗原は Western blot 法の解析では、*S. aureus* 由来の protein A のバンドは認められなかった（図１）。

3. 2 ELISA による血清 IgG 抗体価の測定

血清 IgG の測定では、IgA 腎症、MRSA 感染後腎炎, 紫斑病性腎炎患者の血清では、他の腎炎患者に比し、*S. aureus* に対する抗体価は有意に高値であった（図２）。

3. 3 ELISA 法による血清 IgA 抗体価の測定

血清 IgA では、IgA 腎症患者の抗体価は膜性糸球体腎炎(MCNS) , non - IgA 腎症を除き *S. aureus* に対する抗体価は有意に高値であった（図３）。

3. 4 血清 IgA subclass の検討

S. aureus 抗体価は IgA 腎症患者血清で、*S. aureus* に対する IgA 1 class の抗体価は他の腎疾患患者に比し有意に高値であった（図４上）。 一方、IgA 2 class では、正常人、膜性腎症、膜性増殖性腎炎患者では高値である傾向が認められた（図４下）。

４. 考察および結論

IgA 腎症患者では、*S. aureus* に対する IgA 1 抗体価が高く、抗体の存在下、免疫複合体として糸球体に沈着している可能性が示唆された。
現在､融合蛋白を用いた ELISA 法を開発中であり、本疾患の発症機序の解明、IgA 腎症の診断、ならびにその治療法の開発に有用な手段となると考えられる。

謝辞

S. aureus 標準株を供与していただいた基礎医学系太田敏子教授に感謝いたします。
この報告にあたり多大なるご協力いただいた臨床医学系、小山哲夫教授に感謝いたします。また腎臓内科研究室の川村恵実さん、スタッフの皆様に感謝いたします。

参考文献

[1] 腎と透析：特集 IgA 腎症 30 年, 東京医学社, Vol.46; No.1, 1999.
[2] A. Koyama, M. Kobayashi, N. yamaguchi et al., Glomerulonephritis associated with MRSA infection: A possible role of bacterial superantigen, Kidney int 47; 207-216, 1995.
[3] S. Suzuki, Y. Nakatomi, H. Sato, et al., *Haemophilus parainfluenzae* antigen and antibody in renal biopsy samples and serum of patients with IgA nephropathy. Lancet 345; 12-15, 1994.

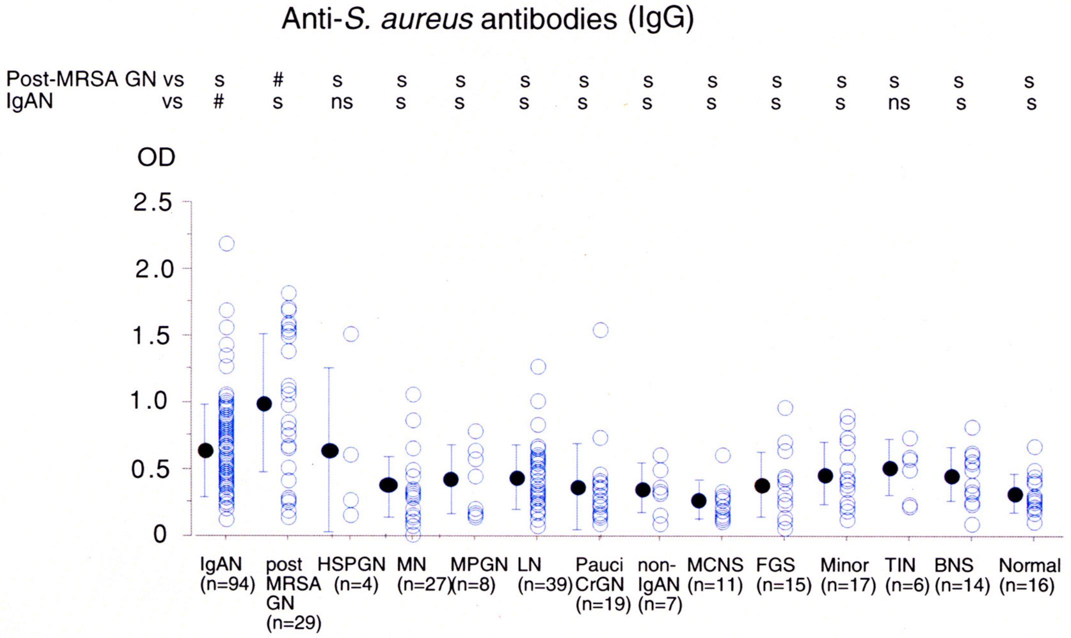


図 2　S. aureusに対する血清 IgG抗体価

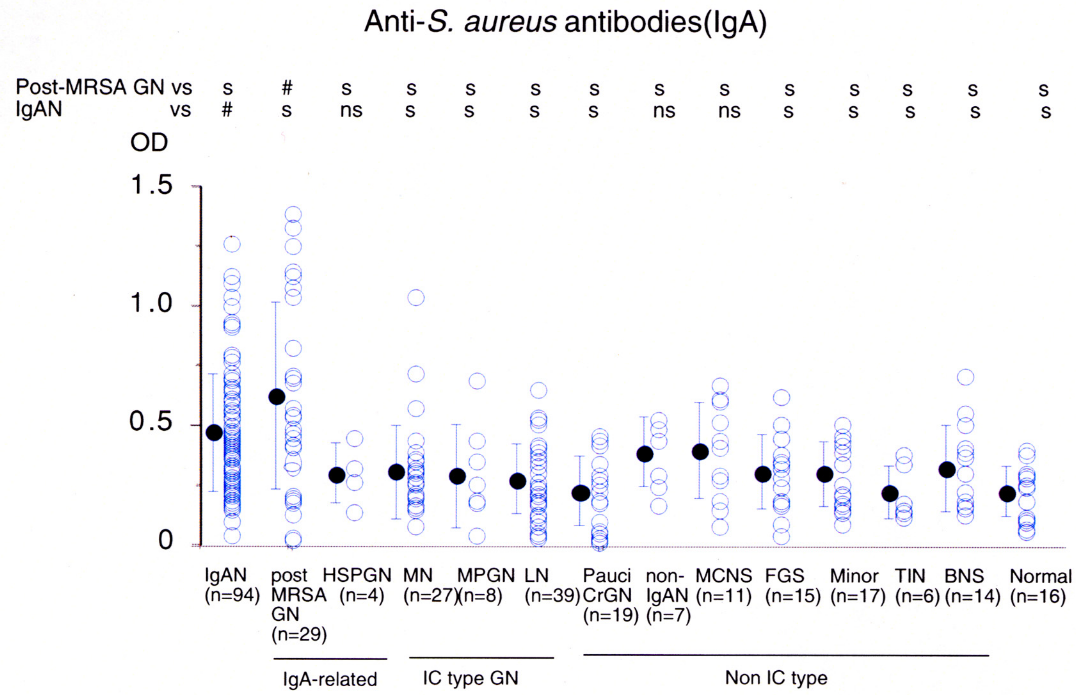


図３．S.aureusに対する血清 IgA抗体価

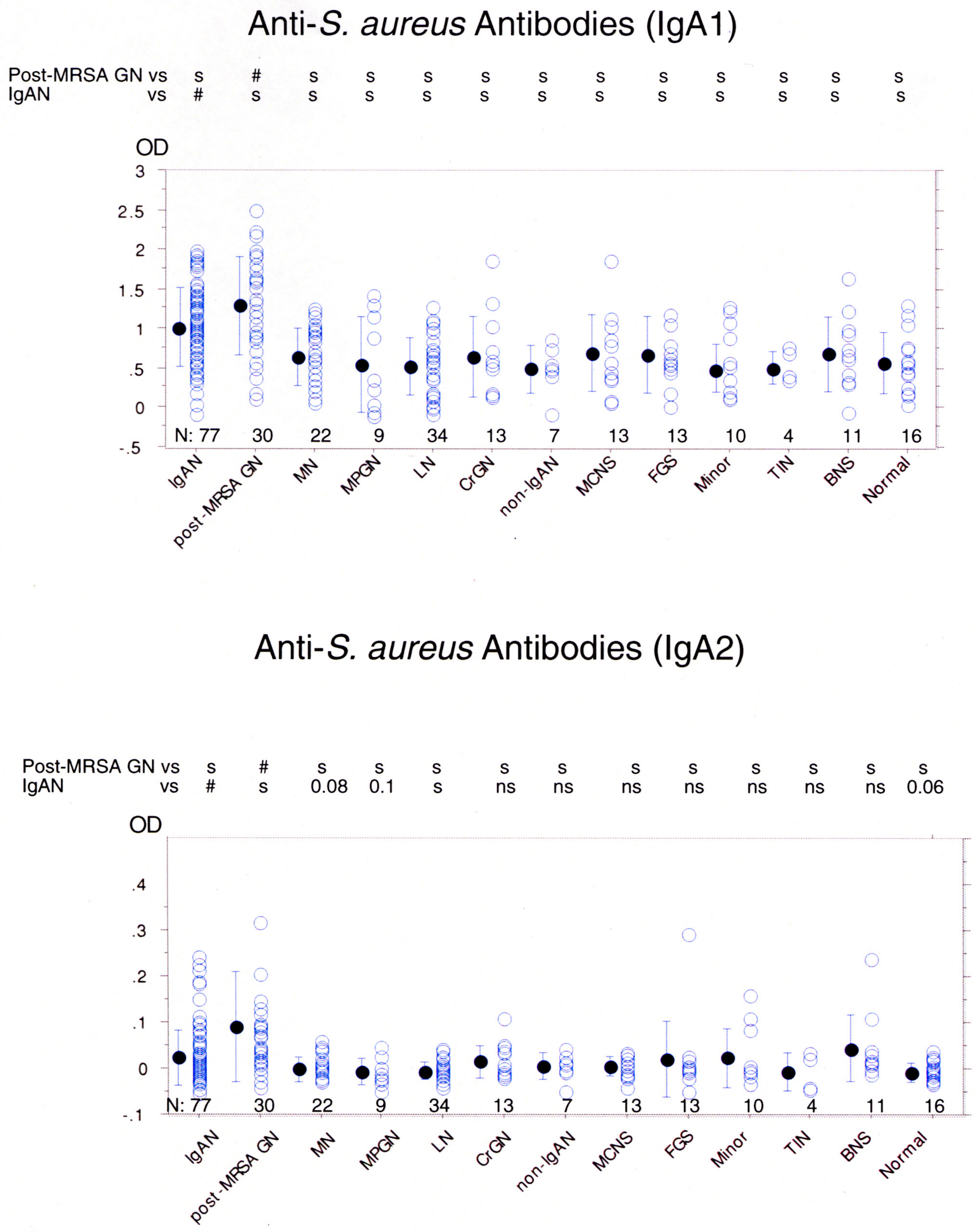


図４． S．aureusに対する血清 IgA1および IgA2の抗体価

HLA 検査の紹介

秦泉寺裕子[1]

[1] 筑波大学人間総合等教育研究支援室（医学系）

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

消化器外科研究室では、臓器移植に必要な組織適合性検査のひとつである HLA 検査を実施している。HLA 検査とはどのような検査なのか。検査方法やその種類、その検査精度や問題点など検討した。

また、臓器移植ネットワークに認定されている HLA 検査施設（第３類）は、茨城県に１箇所しかなく、筑波大学である。全国的に展開され注目を集めている臓器移植の一翼を担っている HLA 検査を中心に紹介する。

１．HLA とは

HLA はヒトの組織適合性抗原 (human leukocyte antigen) である。細胞膜表面に発現する膜蛋白質で、免疫系の細胞性免疫に関与している。また、この抗原をコードしている遺伝子群を HLA 遺伝子複合体という。

ヒトは、細胞内に寄生した病原体由来の蛋白質などを分解し、できた抗原ペプチドを HLA に結合させた形で細胞膜表面に提示する。この提示をうけて免疫担当細胞が免疫反応を活性化させる。これにより、感染した細胞はもとより、病原体を体内から排除する。この一連の免疫応答が移植片に向かって働くと、拒絶反応が起こる。

HLA には、形や組織分布や結合する抗原ペプチドの由来を異にする、クラスⅠとクラスⅡに分けられる。

HLA クラスⅠ分子は、すべての有核細胞と血小板に発現している。ウイルスや細胞内寄生性細菌に感染している細胞と腫瘍細胞など、細胞内由来の分解ペプチドを、クラスⅠ抗原に結合させ提示、免疫担当細胞を活性化させる。

クラスⅡ分子は樹状細胞、マクロファージ、リンパ球 B 細胞、モノサイトなどの抗原提示細胞に限定して発現する。抗原提示細胞は細胞外にある蛋白質や細胞表面にある蛋白質を取り込み分解し、クラスⅡ抗原と結合させ提示、免疫応答を活性化させる。

さらに、クラスⅠ分子は HLA-A,B,C と、クラスⅡ分子は HLA-DR,DQ,DP に細分化される。また、それを両親から１組ずつ受け取ることとなる。(図１)

また、HLA-A,B,DR では、HLA 抗原の種類が多数同定されている。（表１）これは、抗原ペプチド結合部分に差異があることを意味しており、各個人で提示できる抗原ペプチドが限定されることになる。

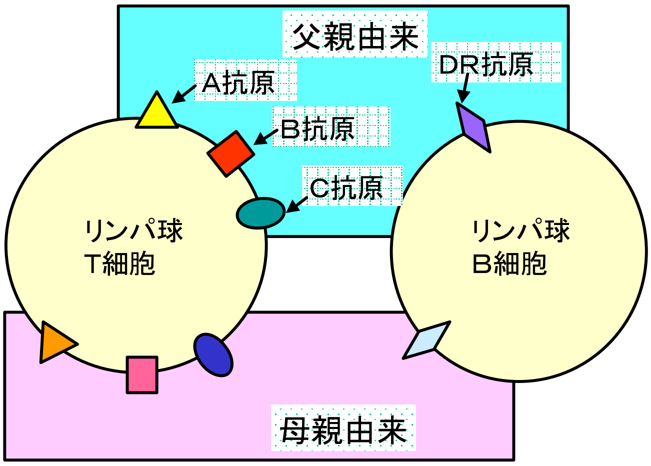


図１. HLA 抗原

表１． 第１１回国際組織適合性ワークショップで公認された HLA 特性

A	B		C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	B49(21)	Cw1	Dw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	B50(21)	Cw2	Dw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B702	B51(5)	Cw3	Dw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B8	B52(5)	Cw4	Dw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B12	B53	Cw5	Dw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	B54(22)	Cw6	Dw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	B55(22)	Cw7	Dw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B15	B56(22)	Cw8	Dw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B16	B57(17)	Cw9(3)	Dw9	DR8	DQ9(3)	
A23(9)	B17	B58(17)	C10(3)	Dw10	DR9		
A24(9)	B18	B59		Dw11(w7)	DR10		
A25(10)	B21	B60(40)		Dw12	DR11(5)		
A26(10)	B22	B61(40)		Dw13	DR12(5)		
A28	B27	B62(15)		Dw14	DR13(6)		
A29(19)	B35	B63(15)		Dw15	DR14(6)		
A30(19)	B37	B64(14)		Dw16	DR15(2)		
A31(19)	B38(16)	B65(14)		Dw17(w7)	DR16(2)		
A32(19)	B39(16)	B67		Dw18(w6)	DR17(3)		
A33(19)	B3901	B70		Dw19(w6)	DR18(3)		
A34(19)	B3902	B71(70)		Dw20			
A36	B40	B72(70)		Dw21			
A43	B4005	B75(15)		Dw22			
A66(10)	B41	B76(15)		Dw23	DR51		
A68(28)	B42	B77(15)					
A69(28)	B44(12)	B7801		Dw24	DR52		
A74(19)	B45(12)			Dw25			
	B46			Dw26	DR53		
	B47	Bw4					
	B48	Bw6					

組織適合性学会ホームページより引用

[1] E-mail:mg99i150@igaku.md.sukuba.ac.jp

また、細胞膜表面の HLA 抗原に対応する DNA 型は、さらに多数となる。DNA レベルでは、膜表面では判定できない塩基配列の違いを調べることができ、それによってさらにたくさんの多型が発見、認定されている。表２は日本人に見られる HLA-DNA 型であるが、それでも表１の HLA 抗原で発見されている HLA 型とは比較にならないほどの数となり、細分化が進んでいる。

A-Allele は HLA-A を DNA 型で表している。頻度は参考までに記載した。HLA 抗原は表 1 の HLA 型に対応する。DNA 型の最初の 2 桁が、ほぼ HLA 抗原型に一致しているが、中には一致しないものや、限定できないもの、DNA 型では判定できるのに細胞膜に発現していないものも見つかっている。

表２．日本人に見られる DNA 型と頻度

A-Allele	頻度	HLA抗原
A*0101	0.2	A1
A*0201	10.9	A2
A*0203	r	A203
A*0206	10.4	A2
A*0207	3.4	A2
A*0210	0.1	A210
A*0215N	Vr	
A*0218	r	A2
A*0242	Vr	–
A*0301	0.8	A3
A*0302	r	A3
A*1101	8.1	A11
A*1102	0.2	A11
A*2402101	35.6	A24
A*2404	r	A24
A*2408	r	A24
A*2420	Vr	–
A*2601	9.8	A26
A*2602	2.2	A26
A*2603	2.1	A26
A*2604	Vr	A26
A*2605	r	A26
A*2606	Vr	A26
A*2611N	Vr	
A*2901	Vr	A29
A*3001	0.3	A30
A*31012	7.7	A31
A*3105	Vr	–
A*3201	Vr	A32
A*3303	7.9	A33
A*6801	r	A68

B-allele	頻度	HLA抗原	B-allele	頻度	HLA抗原
B*0702	5.2	B7	B*39011	r	B3901
B*0705	r	B7	B*39013	4.0	B3901
B*1301	0.9	B13	B*39021	0.2	B3902
B*1302	0.1	B13	B*39022	r	B3902
B*14	r	B14(B64orB65)	B*3904	0.2	B39
B*1501	7.2	B62	B*3923	r	(B39)
B*1502	r	B75	B*40012	5.1	B60
B*1503	r	B72	B*4002	8.2	B61
B*1507	0.7	B62	B*4003	1.1	(B61)
B*1509	Vr	B70	B*4006	5.3	B61
B*15111	1.0	B75	B*4007	Vr	(B4007)
B*15112	Vr	B75	B*4029	Vr	(B61)
B*1518	0.9	B71	B*4402	1.0	B44
B*1522	Vr	B35	B*44031	6.9	B44
B*1526N	Vr		B*4601	3.8	B46
B*1527	Vr	B62	B*4602	Vr	(B46)
B*1528	r	B15	B*4801	2.7	B48
B*1538	r	(B15)	B*51011	7.9	B51
B*1546	Vr	(B70)	B*51021	0.1	B5102
B*1560	Vr	(B62)	B*5103	Vr	B5103
B*2702	Vr	B27	B*52011	13.7	B52
B*2704	r	B27	B*5401	6.5	B54
B*2705	r	B27	B*5402	Vr	(B54)
B*2711	Vr	B27	B*5502	3.2	B55
B*3501	8.6	B35	B*5504	r	B55
B*3510	Vr	(B35)	B*5510	Vr	(B55)
B*3521	Vr	(B35)	B*5601	1.0	B56
B*3531	Vr	(B35)	B*5603	0.2	(B56)
B*3535	Vr	(B35)	B*5605	Vr	(B56)
B*3701	0.2	B37	B*5701	0.1	B57
B*3802	0.3	B38	B*5801	0.6	B58
			B*5901	1.7	B59
			B*6701	1.0	B67
			B*78022	Vr	B78
			B*8101	Vr	B81

DRB1-allele	頻度	HLA抗原
DRB1*0101	4.76	DR1
DRB1*1501	6.08	DR15
DRB1*1502	8.74	DR15
DRB1*1602	0.55	DR16
DRB1*0301	0.22	DR17
DRB1*0401	1.16	DR4
DRB1*0403	3.00	DR4
DRB1*0404	0.22	DR4
DRB1*0405	15.51	DR4
DRB1*0406	3.22	DR4
DRB1*0407	0.44	DR4
DRB1*0410	1.82	DR4
DRB1*0701	0.81	DR7
DRB1*0802	4.99	DR8
DRB1*0803	7.55	DR8
DRB1*0809	r	DR8
DRB1*0901	12.38	DR9
DRB1*1001	0.59	DR10
DRB1*1101	2.94	DR11
DRB1*1201	3.90	DR12
DRB1*1202	2.66	DR12
DRB1*1301	0.86	DR13
DRB1*1302	5.25	DR13
DRB1*1307	0.11	(NJ25)
DRB1*1401	4.45	DR14
DRB1*1405	2.56	DR14
DRB1*1407	0.27	DR14
DRB1*1403	1.57	DR1403
DRB1*1412	r	DR1403
DRB1*1402	r	(HR5)
DRB1*1406	1.36	(HR5)
DRB1*1429	r	(DR14?)

遺伝子頻度：Tanaka, H. et al., Clinical Transplants 1996; 139-144 による日本人 N=493 のアリル頻度
その他、低頻度により上記の調査で検出されなかったアリルを r とし、さらに低頻度と思われるものを Vr とした
抗原名：WHO Nomenclature Committee による定義（ただし（）は標準化委員会による抗原名）

組織適合性学会ホームページより引用

２． HLA 検査方法

消化器外科研究室では、移植医療で検査することが義務付けられている HLA-A,B,DR について検査している。

また、検査方法は、膜表面にある HLA 抗原を直接、抗原抗体反応で調べる方法（血清学的検査）と、HLA 抗原をコードしている遺伝子を、PCR などを用いて解析する方法（DNA 検査）を実施している。

2.1 血清学的検査方法（細胞障害試験）

検体として被験者のリンパ球を用い、テラサキ HLA トレイ(ONE LAMBDA,INC)と交差試験を行う。トレイのウェルには各 HLA 抗原に特異的な抗体が分注されており、被験者の HLA 型に応じて細胞障害反応が起こる。これにより、HLA 型を判定できる。（図２）（写真１）この方法は、トレイに分注されている抗血清の抗体価の高低や、分注されている抗血清の種類で判定できない HLA 型を生じるおそれがある。また、患者さまのリンパ球の状態の良し悪しで反応が弱くなることや、リンパ球を取り出すだけで、細胞が障害されてしまうなどのことも起きうる。

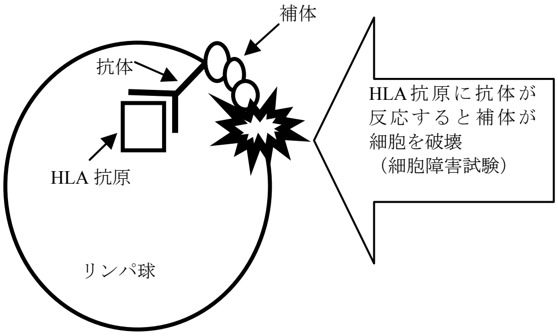


図２．血清学的検査方法の模式図

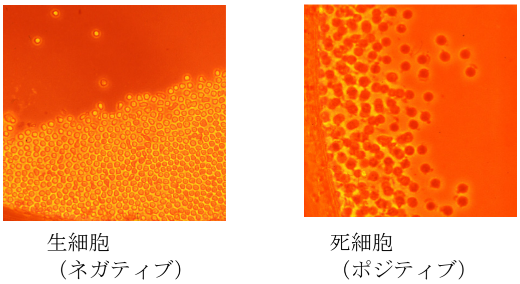


写真１．血清学的検査例

2.2 DNA 検査方法

消化器外科研究室では、マイクロ SSP (One Lambda, Inc)と Dynal RELI SSO (DYNAL BIOTECH, Inc) の２種類の検査キットを使用して HLA 検査を実施している。

マイクロ SSP は、各 HLA 抗原をコードしているプライマーと被験者の DNA を PCR 増幅することで HLA 型を判定する。（図３）(写真２)

各 HLA 型に対応する数のプライマーが必要となり PCR が煩雑になるが、判定にかかる時間は短縮でき３時間程度で結果を出すことができる。対応できる検査数は限られるので、少検体数向きである。

プライマーの種類を変えることで、もっと細かい塩基配列の違いを読み取ることも可能となっている。

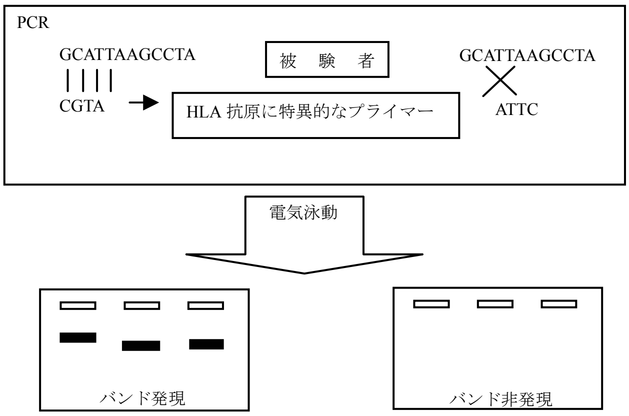


図３. SSP 法の模式図

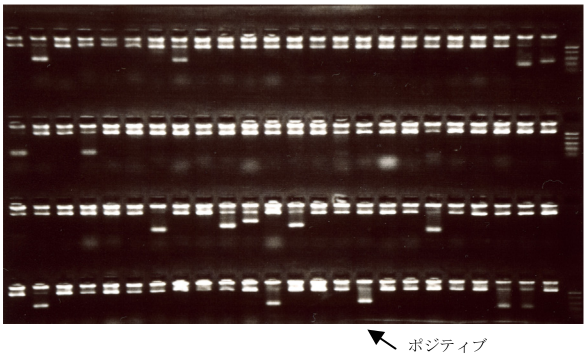


写真２．マイクロ SSP JPN の検査例

Dynal RELI SSO は、細いナイロン膜に各 HLA 抗原に特異的なプローブが貼り付けてあるキットを使用する。これに被験者の DNA を PCR にて増幅しビオチン標識して 1 本鎖にしたものをハイブリダイズ、発色させて HLA 型を判定する。（図４）(写真３)

PCR は一度でよく、1 枚のナイロン膜にハイブリダイズするので間違いは起こりにくく、操作が容易である。しかし、ハイブリダイズ、発色作業に多少時間がかかり、6 時間を要する。多数の検体を一度に処理することが可能で、多検体向きである。

また、さらに細かく塩基配列を決定する作業には不向きである。

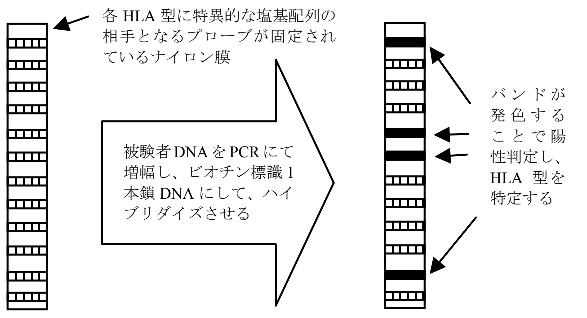


図４. SSO 法の模式図

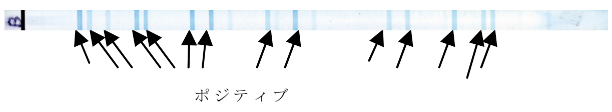


写真３. ダイナル　リライ　SSO の検査例

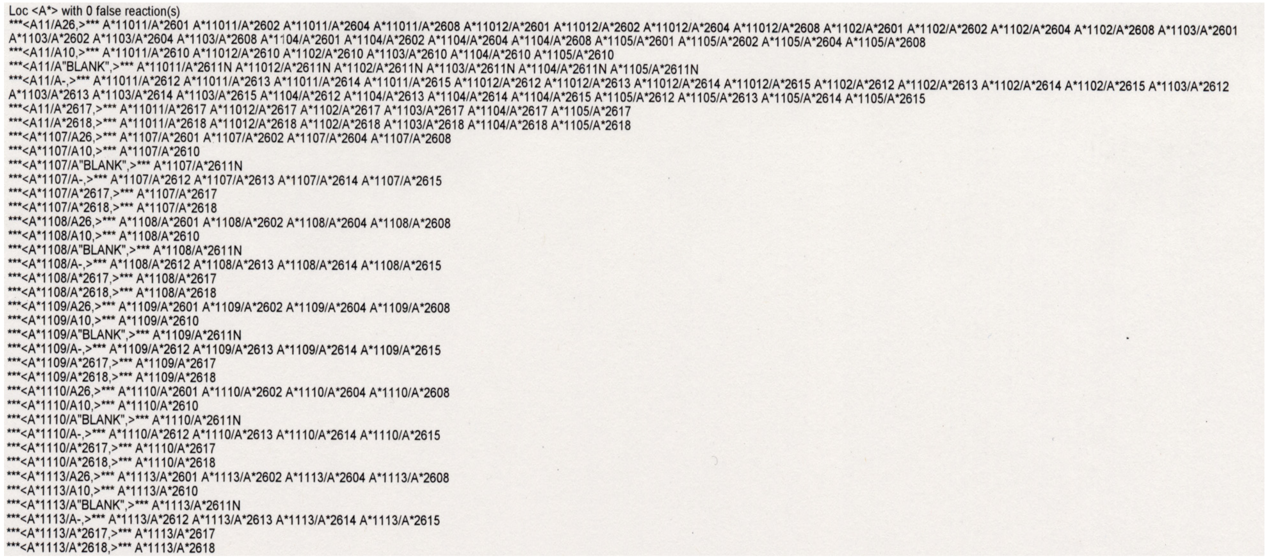
３. 検査結果の一例

HLA-A の、DNA 検査結果を比較して、検討する。

図５には SSP 法での HLA-A の判定結果を示した。図６には SSO 法での判定表と判定結果を示している。いずれも多数の組み合わせが判定でき、この中のどの DNA 型が被験者の DNA 型か区別することはできない。また、プライマー、プローブの塩基配列が違うため、組み合わせの種類も 2 法では違う結果となった。しかし、上 2 桁ではいずれも同じ結果であり、血清学的検査と一致している。以上のことから、この被験者の HLA 型は HLA-A(11,26)であることがいえる。

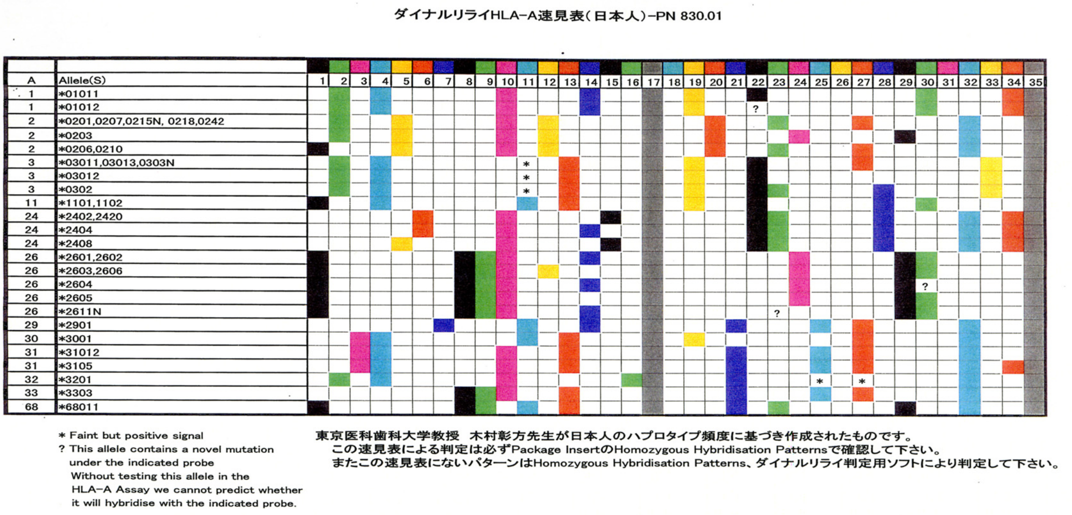
血清学的検査では細胞膜表面に発現している HLA 抗原を 2 桁で判定している。しかし,DNA 検査では、4 桁になっている。しかも、検査結果はすっきりと 1 つではない。これは、HLA 遺伝子が極めて多型性が高く、相同性遺伝子が多いことが原因となっている。さらに、新しい DNA 型（アリル）は 2002 年には HLA-ABC だけでも 900 アリルを超えている。また、問題点として遺伝子型では区別できるが、血清学的には同一のものや、細胞膜表面に HLA 抗原として提示しないアリルも見つかっており、すっきりとした判定は、非常に困難なものになっている。

しかし、日本人に見られる DNA 型や、SSP 法と SSO 法を組み合わせて考えていくと、かなり HLA 型を絞り込むことはできる。また、直接遺伝子をシーケンスして読み取る方法などもっと精度の高い検査方法を導入するという考え方もある。ただ、この研究室では移植医療で拒絶反応を抑え、移植臓器ができるだけ長く生着することを目的としている。現在では免疫寛容誘導するための検討を進める必要があると考えている。



```
Loc <A*> with 0 false reaction(s)
***<A11/A26,>*** A*11011/A*2601 A*11011/A*2602 A*11011/A*2604 A*11011/A*2608 A*11012/A*2601 A*11012/A*2602 A*11012/A*2604 A*11012/A*2608 A*1102/A*2601 A*1102/A*2602 A*1102/A*2604 A*1102/A*2608 A*1103/A*2601
A*1103/A*2602 A*1103/A*2604 A*1103/A*2608 A*1104/A*2601 A*1104/A*2602 A*1104/A*2604 A*1104/A*2608 A*1105/A*2601 A*1105/A*2602 A*1105/A*2604 A*1105/A*2608
***<A11/A10,>*** A*11011/A*2610 A*11012/A*2610 A*1102/A*2610 A*1103/A*2610 A*1104/A*2610 A*1105/A*2610
***<A11/A"BLANK",>*** A*11011/A*2611N A*11012/A*2611N A*1102/A*2611N A*1103/A*2611N A*1104/A*2611N A*1105/A*2611N
***<A11/A-,>*** A*11011/A*2612 A*11011/A*2613 A*11011/A*2614 A*11011/A*2615 A*11012/A*2612 A*11012/A*2613 A*11012/A*2614 A*11012/A*2615 A*1102/A*2612 A*1102/A*2613 A*1102/A*2614 A*1102/A*2615 A*1103/A*2612
A*1103/A*2613 A*1103/A*2614 A*1103/A*2615 A*1104/A*2612 A*1104/A*2613 A*1104/A*2614 A*1104/A*2615 A*1105/A*2612 A*1105/A*2613 A*1105/A*2614 A*1105/A*2615
***<A11/A*2617,>*** A*11011/A*2617 A*11012/A*2617 A*1102/A*2617 A*1103/A*2617 A*1104/A*2617 A*1105/A*2617
***<A11/A*2618,>*** A*11011/A*2618 A*11012/A*2618 A*1102/A*2618 A*1103/A*2618 A*1104/A*2618 A*1105/A*2618
***<A*1107/A26,>*** A*1107/A*2601 A*1107/A*2602 A*1107/A*2604 A*1107/A*2608
***<A*1107/A10,>*** A*1107/A*2610
***<A*1107/A"BLANK",>*** A*1107/A*2611N
***<A*1107/A-,>*** A*1107/A*2612 A*1107/A*2613 A*1107/A*2614 A*1107/A*2615
***<A*1107/A*2617,>*** A*1107/A*2617
***<A*1107/A*2618,>*** A*1107/A*2618
***<A*1108/A26,>*** A*1108/A*2601 A*1108/A*2602 A*1108/A*2604 A*1108/A*2608
***<A*1108/A10,>*** A*1108/A*2610
***<A*1108/A"BLANK",>*** A*1108/A*2611N
***<A*1108/A-,>*** A*1108/A*2612 A*1108/A*2613 A*1108/A*2614 A*1108/A*2615
***<A*1108/A*2617,>*** A*1108/A*2617
***<A*1108/A*2618,>*** A*1108/A*2618
***<A*1109/A26,>*** A*1109/A*2601 A*1109/A*2602 A*1109/A*2604 A*1109/A*2608
***<A*1109/A10,>*** A*1109/A*2610
***<A*1109/A"BLANK",>*** A*1109/A*2611N
***<A*1109/A-,>*** A*1109/A*2612 A*1109/A*2613 A*1109/A*2614 A*1109/A*2615
***<A*1109/A*2617,>*** A*1109/A*2617
***<A*1109/A*2618,>*** A*1109/A*2618
***<A*1110/A26,>*** A*1110/A*2601 A*1110/A*2602 A*1110/A*2604 A*1110/A*2608
***<A*1110/A10,>*** A*1110/A*2610
***<A*1110/A"BLANK",>*** A*1110/A*2611N
***<A*1110/A-,>*** A*1110/A*2612 A*1110/A*2613 A*1110/A*2614 A*1110/A*2615
***<A*1110/A*2617,>*** A*1110/A*2617
***<A*1110/A*2618,>*** A*1110/A*2618
***<A*1113/A26,>*** A*1113/A*2601 A*1113/A*2602 A*1113/A*2604 A*1113/A*2608
***<A*1113/A10,>*** A*1113/A*2610
***<A*1113/A"BLANK",>*** A*1113/A*2611N
***<A*1113/A-,>*** A*1113/A*2612 A*1113/A*2613 A*1113/A*2614 A*1113/A*2615
***<A*1113/A*2617,>*** A*1113/A*2617
***<A*1113/A*2618,>*** A*1113/A*2618
```

図５. SSP 法の判定例



Type summary: HLA-A*11 & 26
NMDP Code: HLA-A*11XX & 26XX;

1 HLA-A*11 & 26

HLA-A*1109 & 2601,2602,2610,2615,2617
HLA-A*11011,11012,1102,1107 & 2616
HLA-A*1109 & 2616
HLA-A*11011,11012,1102,1107 & 2601,2602,2610,2615,2617
HLA-A*11011,11012,1102,1107 & 2604
HLA-A*1109 & 2604
HLA-A*1108 & 2604
HLA-A*1108 & 2608
HLA-A*1103 & 2616
HLA-A*1108 & 2616
HLA-A*1103 & 2604
HLA-A*1108 & 2601,2602,2610,2615,2617
HLA-A*1103 & 2601,2602,2610,2615,2617
HLA-A*1109 & 2612
HLA-A*11011,11012,1102,1107 & 2612
HLA-A*1108 & 2612
HLA-A*1103 & 2612

図６．SSO 法の判定表と判定例

４．臓器移植ネットワーク

臓器移植ネットワークとは、国内唯一の臓器提供の仲介を行う組織である。仲介する臓器は、心臓、肝臓、肺、膵臓、腎臓、小腸である。また、移植医療の普及・啓発、移植希望者の登録、臓器提供者への対応、適正かつ公平な移植者の選択などの業務を遂行されている。H15 年 7 月現在、心臓７０名、肺７２名、肝臓６２名、腎臓１２、４９１名もの移植を待たれる患者さまが登録されている。

筑波大学は、腎臓、膵臓の移植施設、また今回紹介する HLA 検査施設（第３類）に認定されており、ネットワークと協力し移植医療の一翼を担っている。

研究室では、主に腎臓移植希望者の HLA 検査、ネットワークへの登録、年１回の血清保存、また、検査精度を保つために義務化されているクオリティコントロールに参加している。

茨城県では、腎移植希望者は約２５０名登録されており、一日も早く移植が実現されることを願っている。

５．これからの HLA 検査

HLA 検査方法は常に進化し続けている。また、HLA-DNA 型もどんどん増え続けている。検査技術の向上はもとより、新しい情報にも耳を研ぎ澄ませて、患者さまや、依頼者である先生方により正確な検査結果を提供できるように、日々努力することがもとめられていると考える。

謝辞

今回の発表にあたり適切なご助言、ご指導を頂きました湯沢賢治先生に、この場をかりてお礼申し上げます。

参考資料

[1] 臓器移植における HLA-DNA タイピングマニュアル 厚生科学研究ヒトゲノム再生医療等研究事業 (H12 年度)
[2] 臓器移植ネットワークホームページ URL:http://www.jotnw.or.jp/
[3] 組織適合性学会ホームページ URL:http://square.umin.ac.jp/JSHI/frame.html
[4] 免疫学最新イラストレイテッド
[5] 平成 15 年度日本組織適合性学会・認定 HLA 検査技術者講習会　資料
[6] VERITAS マイクロ SSP HLA DNA タイピングキット、ダイナル　リライ SSO タイピングキット取り扱い説明書

日本の高山帯とシベリアサヤン山脈における単子葉植物 *Carex*（スゲ属）集団内の種組成の比較

路川宗夫[1]
筑波大学 生命・情報等教育研究支援室（生物）
〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

ロシア連邦のサヤン山脈で *Carex*（単子葉植物スゲ属）を中心に採集調査を行った。その時の採集品を検討した結果、日本の北方地域と高山帯に自生する種と同じ種がいくつか含まれていることが判明した（路川 1994）。生育地域と出現種の関係を明らかにするために、今回、サヤン山脈の 3 箇所の主要峰での採集品を整理して 1 つの集団と想定し、一方で、日本の高山における採集品を整理し、本州の高山を 3 箇所、北海道の高山を 3 箇所、それぞれ別々の集団と想定して、それぞれの集団におけるスゲの種組成を明確にした上で、シベリアと日本という遠隔地間のスゲ集団の比較をこころみた。

これらの地域のスゲ集団の比較から、シベリアと日本の高山には、ハクサンスゲ、カラフトカサスゲ、ヒメカワズスゲ、タカネシバスゲの 4 種のスゲが共通要素として分布していることが明らかになった。これらのスゲはそれぞれの地域で、様々な分布の様式をもった他の種と混在した形で生育が確認された。上記の 4 種のスゲはいずれも周北極要素と考えられる。地史のなかで、ユーラシア大陸と日本が陸続きだったころに分布を広げていたが、地球の温暖化にともなってユーラシア大陸と日本列島が離れることで分布域が分断され、生育の場が次第に寒冷な地域に狭められていった結果、シベリアと日本の高山帯の一部に同じ種が生育しているのだと解釈できる。

シベリアと日本の高山のスゲ集団の共通の要素である 4 種のスゲは周北極要素からの遺存種であると結論づけられる。

１．はじめに

「スゲ属とイネ科の植物だけを採集してくれればよいから」という甘い言葉に誘われて、シベリアの大地に足を踏み入れたのは 10 年前の 1993 年７月６日であった。採集開始の当初から日本にも生えているスゲが何種類か見られ、日本から遠く離れたシベリアの大地に、日本の高山帯に自生するスゲと同じ種が自生している理由は何だろうと漠然とした疑問を抱きながら採集を続けた。帰国して、日本の高山とシベリアに隔離分布している原因として、地球規模の気候の変動を考えなければならないと考えるようになった。スゲという地味な植物にも、その分布は、地史的な膨大な時間の流れを考えないと説明できないロマンが秘められているのではないか、そう考えたのが本研究の出発点である。

２．調査地の概要

表 1 に種組成のもとになったスゲの標本を整理して、集団の中で位置づけるために調査地を記号で示し、地名と標高、調査時期を示した。

A. クズニイツキー・アラタウ山：サヤン山脈の最北端にあり、標高 1700m の山だが山腹には小さな湖や湿原が多く山全体が湿潤である。また山頂一帯はなだらかな高原で、雪渓が多く残っていた。湿原にはシベリア固有の種が多く自生していた。

表 1.　調査地の概要

記号	山名	標高	調査時期
A	クズニイツキー・アラタウ山	1700m	1993年7月16～17日
B	サヤンスキー峠	2300m	1993年7月20～21日
C	トウスカンチック山	1986m	1993年8月7日
D	赤石岳～聖岳	3120m	1985年8月24～27日
E	朝日連峰	1800m	1981年8月4～8日
F	早池峰山～薬師岳	1910m	1987年7月28～29日
G	雨竜湿原～暑寒別岳	1490m	1983年7月27～29日
H	幌尻岳～戸蔦別岳	2052m	1984年８月4～6日
I	石狩岳	1962m	1985年7月28～30日

[1] Tel: 029-853-4879

スゲ属については、山腹の池塘にカラフトカサスゲが、湿原にはカブスゲ、ミガエリスゲ、ダケスゲが見られ、乾いた岩場にはカミカワスゲ、タカネシバスゲ、ヒメカワズスゲ、トナカイスゲが見られた。山頂付近にはスゲは少なかった。サヤン山脈で調査した山で最もスゲの種類の豊富な山であった。

B. サヤンスキー峠：サヤン山脈の南西で、標高 1900～2300m の範囲を調査した。峠には広大な湿原が広がり、湿原のほとりにヒメアゼスゲ、ハクサンスゲ、イッポンスゲが生育していた。またカミカワスゲがいたるところに見られた。湿原はスゲの種類が多いが、湿原のそばにそびえる 2300m の無名峰はやや乾燥していてスゲは少なかった。

C. トウスカンチック山：サヤン山脈のほぼ中央部に位置し、標高 1986m の岩峰である。山のふもとには湿原が広がる。ふもとの湿原や川のほとりにスゲが多く、カブスゲやハクサンスゲが見られた。ここでもカミカワスゲが多く見られた。山頂付近は岩が多くスゲは少なかった。

D. 赤石岳～聖岳：日本の本州中部、標高 1700m の椹島の登山口から最高峰赤石岳山頂 3120m を乗り越えるのに、歩いて 2 日を要する。この山は南アルプスのほぼ中央部にあって調査が非常に困難である。高低差 1400m 以上を食料、燃料、炊事用具、雨具、防寒着、寝袋、調査用具など必要なものすべてを携行しなくてはならない。綿密な調査計画を立て、しかも 5～6 人の調査隊を編成して荷物を分担して担ぎ上げないと調査は不可能で、こうして得られたスゲの採集品は貴重である。赤石岳の登りでヒメカワズスゲとタカネシバスゲの自生を確認した。聖岳山頂付近に自生していたタカネナルコは日本での分布はきわめて狭い。山の大きさからみるとスゲの種類相としては豊かであるとは言いがたい。

E. 朝日連峰：標高は最高地点でも 1800m にすぎないが、日本海側に位置する連峰で、日本海側に片寄って分布するミチノクハリスゲ、ナガボノコジュズスゲなどのスゲが自生する。ここにはシベリアとの共通種は見られなかった。

表２. シベリアの集団における *Carex* の種組成

	種小名	和名	生育地	区分
1	*altaica*		A,B	シベリア固有
2	*amblyorhyncha*		C	周北極要素
3	*brunnescens*	ヒメカワズスゲ	A	周北極要素
4	*caespitosa*	カブスゲ	A,C	ユーラシア要素
5	*canescens*	ハクサンスゲ	B,C	周北極要素
6	*capillaris*	タカネシバスゲ	A,C	周北極要素
7	*curaica*		B	シベリア固有
8	*eleusinoides*	ヒメアゼスゲ	B	北大平洋要素
9	*enervis*		A,B	シベリア固有
10	*globularis*	トナカイスゲ	A	ユーラシア要素
11	*lasiocarpa*		A	周北極要素
12	*ledebouriana*		A,B,C	シベリア固有
13	*leporina*		C	シベリア固有
14	*media*		B,C	周北極要素
15	*melanocephala*		B	シベリア固有
16	*orbicularis*		A	シベリア固有
17	*pauciflora*	ミガエリスゲ	A	周北極要素
18	*paupercula*	ダケスゲ	A	ユーラシア要素
19	*perfusca*		A,C	シベリア固有
20	*praecox*		B,C	周北極要素
21	*redowskiana*		B	シベリア固有
22	*rostrata*	カラフトカサスゲ	A	周北極要素
23	*sabynensis*	カミカワスゲ	A,B,C	北・東アジア要素
24	*stenocarpa*		A,B,C	北・東アジア要素
25	*tenuiflora*	イッポンスゲ	B	周北極要素

学名は種小名のみを表示する。

表 3. 日本本州の集団における *Carex* の種組成

	種小名	和名	生育地	区分
1	*albata*	ミノボロスゲ	E,F	日本固有
2	*aphyllopus*	タテヤマスゲ	E	日本固有
3	*augustinowiczii*	ヒラギシスゲ	D	北・東アジア要素
4	*bipartia* v. *scaber*	タカネヤガミスゲ	D	北大平洋要素
5	*blepharicarpa*	ショウジョウスゲ	D,E,F	北・東アジア要素
6	*brunnescens*	ヒメカワズスゲ	D	周北極要素
7	*capilalcea* v. *sachalinensis*	ミチノクハリスゲ	E	北・東アジア要素
8	*capillaris*	タカネシバスゲ	D	周北極要素
9	*cuneata*	ミチノクホンモンジスゲ	E	日本固有
10	*doenitzii*	コタヌキラン	F	日本固有
11	*fernaldiana*	イトスゲ	D	北・東アジア要素
12	*foliosissima*	オクノカンスゲ	E,F	北・東アジア要素
13	*hakkodensis*	イトキンスゲ	D,E	北・東アジア要素
14	*hakonensis*	コハリスゲ	D,F	北・東アジア要素
15	*jacens*	ハガクレスゲ	F	北・東アジア要素
16	*kiotensis*	テキリスゲ	D	日本固有
17	*multifolia*	ミヤマカンスゲ	E,F	日本固有
18	*omiana* v. *monticola*	カワズスゲ	E	日本固有
19	*oxyandra*	ヒメスゲ	D,E,F	北・東アジア要素
20	*planiculmis*	ヒカゲシラスゲ	D	北・東アジア要素
21	*podogyna*	タヌキラン	E	日本固有
22	*pyrenaica*	キンスゲ	D	周北極要素
23	*sabynensis*	カミカワスゲ	F	北・東アジア要素
24	*scita*	ミヤマアシボソスゲ	D,E	日本固有
25	*siroumensis*	タカネナルコ	D	北・東アジア要素
26	*stenantha*	イワスゲ	D	日本固有
27	*subunmbellata*	ミヤケスゲ	E	北・東アジア要素
28	*tenuiformis*	オノエスゲ	F	北・東アジア要素
29	*vanioti*	ナガボノコジュズスゲ	E	日本固有

学名は種小名のみを表示し、v.は変種(var.)の略である。

表 4. 日本北海道の集団における *Carex* の種組成

	種小名	和名	生育地	区分
1	*albata*	ミノボロスゲ	G	日本固有
2	*sugustinowiczii*	ヒラギシスゲ	G	北・東アジア要素
3	*blepharicarpa*	ショウジョウスゲ	G,H,I	北・東アジア要素
4	*brunnescens*	ヒメカワズスゲ	I	周北極要素
5	*canescens*	ハクサンスゲ	G,I	周北極要素
6	*dispalata*	カサスゲ	G	北・東アジア要素
7	*flavocuspis*	ミヤマクロスゲ	H	北・東アジア要素
8	*foliosissima*	オクノカンスゲ	G	北・東アジア要素
9	*hakkodensis*	イトキンスゲ	G,H	北・東アジア要素
10	*hakonensis*	コハリスゲ	G	北・東アジア要素
11	*jacens*	ハガクレスゲ	G,I	北・東アジア要素
12	*limosa*	ヤチスゲ	G	周北極要素
13	*lyngbyei*	ヤラメスゲ	G	周北極要素
14	*michauxiana* v. *asiatica*	ミタケスゲ	G	北・東アジア要素
15	*middendorffii*	ホロムイスゲ	G	北・東アジア要素
16	*mollicula*	ヒメシラスゲ	G	北・東アジア要素
17	*omiana* v. *monticola*	カワズスゲ	G	日本固有
18	*oxyandra*	ヒメスゲ	G,I	北・東アジア要素
19	*parciflora*	グレーンスゲ	G	北・東アジア要素
20	*pyrenaica*	キンスゲ	I	周北極要素
21	*rhynchophysa*	オオカサスゲ	G	ユーラシア要素
22	*rostrata*	カラフトカサスゲ	G	周北極要素
23	*sachalinensis*	ゴンゲンスゲ	I	北・東アジア要素
24	*sadoensis*	サドスゲ	G	北・東アジア要素
25	*scita* v. *riishirensis*	リシリスゲ	G,H,I	北・東アジア要素
26	*stenantha*	イワスゲ	H,I	日本固有
27	*traiziscana*	ヒロハオゼヌマスゲ	G	北・東アジア要素
28	*urostachys*	キンチャクスゲ	G	北・東アジア要素
29	*vesicaria*	オニナルコスゲ	G	周北極要素

学名は種小名のみを表示し、v.は変種(var.)の略である。

F.　早池峰山～薬師岳：北上山地を代表する高山として、貴重な高山植物群落を有する。ここではカミカワスゲとオノエスゲが確認された。カミカワスゲはシベリアにもたくさん見られた共通種である。

G.　雨竜湿原～暑寒別岳：シベリアに足を踏み入れた年の10年前､初めて北海道の山々を調査した。標高 800m の雨竜湿原を見てそのスゲの豊富さに感激した。湿原を保護するために前暑寒岳の登山口まで延々と木道が渡されていた。必要最低限の採集をして、前暑寒岳とさらに奥の本暑寒岳の山頂までスゲを調査した。高山のスゲが豊富に見られ、スゲの種類相の豊かさでは他に類を見ない。湿原でハクサンスゲとカラフトカサスゲが見出された。

H.　幌尻岳～戸蔦別岳：日高山脈の最高峰幌尻岳 2052m の山頂に立ったのは 1984 年 8 月 5 日であった。標高でいえば本州の高山に比較したなら大したことはないが、山は奥深い。登山口に無人の避難小屋があるだけで、七つ沼カールという火口湖のほとりにテントを張って調査した。さらに野生熊が出現する心配もあり、地元猟師の護衛つきで、調査は困難をきわめた。苦労して登ったわりにはスゲ相があまりにも貧弱な山であった。

I.　石狩岳：北海道の屋根と呼ばれる大雪山系の最南端に位置する石狩岳 1962m は山頂を往復することの困難な山であった。6 名の調査隊を編成してテント 2 張りを担いで登山口から山頂までの植物を調査した。高山帯のスゲ相は単調だったがヒメカワズスゲとハクサンスゲが含まれていた。

３．種組成の比較

表 2 にシベリアの集団、表 3 に日本本州の集団、表 4 に日本北海道の集団におけるそれぞれのスゲの種組成を示した。和名があるものは示し、生育地 A～I はそれぞれの種の生育地（採集地）である。標本の番号は示していないが、取扱ったすべての種に対応する標本を筆者が保管しており、標本にもとづいた厳密な同定を行っている。

種の分布を次の 5 つの要素区分に分けて示した。すなわち（1）シベリア固有：シベリア地域以外に分布が確認されていないもの。（2）周北極要素：ヨーロッパを含むユーラシア大陸と日本（必ずしも日本が含まれるとは限らない）、北アメリカ大陸の北極圏を取り巻く地域に分布が確認されているもの。（3）北太平洋要素：北および東アジアと日本（必ずしも日本が含まれるとは限らない）、北アメリカ西岸地域（アラスカやカナダ）の太平洋沿岸地域に分布が確認されているもの。（4）ユーラシア要素：ヨーロッパを含むユーラシア大陸に分布が確認されているもの。（5）北・東アジア要素：中国、モンゴル、朝鮮半島から日本を含め、ロシア極東地域から中央シベリアの東側一帯に分布が確認されているもの。これらは北米植物誌（2002）、シベリア植物誌（1990）、ロシア植物誌（1976）、ヨーロッパ植物誌（1980）、日本環境庁植物生育地類型表（1986）などを参考として判断した。

シベリアの集団（表 2）には周北極要素が 10 種生育していることがわかった。すなわちヒメカワズスゲ、ハクサンスゲ、タカネシバスゲ、ミガエリスゲ、カラフトカサスゲ、イッポンスゲ、*Carex amblyorhyncha*、*C. lasiocarpa*、*C. media*、*C. praecox* である。また日本にも自生するカブスゲとダケスゲがユーラシア要素に分類され、カミカワスゲが北・東アジア要素として分類される。日本にはない *C. stenocarpa* もこれにあたる。ほかはすべてシベリア固有種のようである。

一方、日本本州の集団（表 3）には周北極要素としてヒメカワズスゲ、タカネシバスゲ、キンスゲの 3 種が認められ、また日本固有種は 11 種、北・東アジア要素 14 種が認められた。

日本北海道の集団（表 4）から、周北極要素はヒメカワズスゲ、ハクサンスゲ、ヤチスゲ、ヤラメスゲ、キンスゲ、カラフトカサスゲ、オニナルコスゲの 7 種が認められ、日本固有種はミノボロスゲ、カワズスゲ、イワスゲの 3 種、ユーラシア要素がオオカサスゲの 1 種、残りの 18 種はすべて北・東アジア要素であることがわかった。

日本でも本州と北海道を別々の集団として比較すれば、日本固有種は本州に多く北海道で少ないことがわかる。また意外なほど北・東アジア要素が多く、日本列島とユーラシア大陸の植物分布のつながりの強固さがうかがえる。

ここで周北極要素に注目したい。シベリアの集団で 10 種を数える、日本の 2 つの集団を 1 つの集団として考えたら 8 種になる。以上をまとめるとシベリアと日本に共通する種はヒメカワズスゲ、タカネシバスゲ、ハクサンスゲ、カラフトカサスゲの 4 種である。

４．周北極要素についての考察

日本とシベリアという距離的にかけ離れた地域に同じ種のスゲが生育する理由について考えてみる。上記 4 種のスゲはいずれも周北極要素と考えることができる。周北極要素とは、海水面が現在よりずっと低く、北アメリカ大陸とユーラシア大陸そして日本の北海道と本州が陸続きだった氷河期に、これらの地域に広く分布していた動植物のことである（清水 1983、増沢 1997）。これらの生物の多くは、その後の地球の温暖化によって分布を狭め、現在の北極を取り囲む地域に隔離して生育している。

およそ 2 万年前の氷河期の最寒冷期に分布が拡大していたものが、その後の地球の温暖化によって分布が分断されることになった植物の一群が、ここでいう周北極要素である。これらの事実は植物分類学、

植物地理学のみならず、古生物学や地質学さらにそれらを総合的に取り扱う第四紀学など多くの学問分野の研究の発展によってかなり鮮明に浮き彫りになりつつある（藤田 1973、湊 1976）。

スゲ以外の被子植物ではリンネソウ、ムシトリスミレ、タカネシオガマ、キバナシオガマ、ミツガシワ、ツマトリソウ、ヒメシャクナゲ、ツルコケモモ、コケモモ、クロマメノキ、ヤナギラン、キバナノコマノツメ、ウメバチソウ、ナガバノモウセンゴケ、タカネキンポウゲ、クモマキンポウゲ（清水 1983）など、高山植物の多くの種に周北極要素が含まれており、これらも遺存的に隔離分布しているものである。

日本の高山帯とシベリアに上記のスゲが自生している事実は、かつて日本列島とユーラシア大陸が陸地でつながっていた時代に、これらの植物がシベリアから日本まで分布を広げていたことを強く示唆している。分布が拡大したのは、およそ 2 万年前の新生代第四紀、洪積世後期のウルム氷期の最盛期の頃と思われる。この時代は、地球規模の氷河期の最寒冷期で、日本を取り巻く海面は今から 130m も低かったことが第四紀年代表（井尻 1979）からうかがえる。2 万年前、現在高山帯と北方地域に自生していたこれらのスゲは、低地にまで広く分布していたと考えられる。ユーラシア大陸と日本が陸続きだった頃に分布を広げていたこれらのスゲは、地球の温暖化に伴って、やがて海水面が上昇するにつれて、次第に寒冷な地域に生息地を狭められ、その結果、シベリアと日本の高山帯の一部に、別の種に進化することもなく、同じ種が現在まで生存してきたものと考えられる。

以上からシベリアと日本の高山のスゲ集団の共通要素である 4 種のスゲは、周北極要素からの遺存種であると結論づけられる。地理的に遠く離れたそれぞれの地域では、2 万年にもわたる長期間、周北極要素が遺存種として生存を続ける一方で、それぞれに新たな種が加わることで、固有種と遺存種が混在するスゲ集団が確立してきたものと考えられる。

各地の高山に広がるスゲの湿地は、一見するとどれも同じ風景に見えるが、地道な植生の調査の積み重ねから、このような地球と生物の壮大な進化の歴史が見えてくる。

謝辞

シベリアサヤン山脈での調査の機会を与えて下さった東京都立大学の若林三千男博士と国立科学博物館の門田裕一博士に、また調査中いろいろと御教示いただいたシベリア中央植物園のイワン・モイシビッチ・クラスノボロブ博士、マリア・ロモノソワ博士、アレキサンドル・クラスニコフ博士にお礼申し上げます。また日本の高山帯でのスゲの調査の機会を与えて下さった元国立科学博物館研究官の故館岡亜緒博士にお礼申し上げます。最後に本稿を纏めるにあたり、御指導いただいた筑波大学生物科学系の井上　勲博士にお礼申し上げます。

参考文献

[1] 路川宗夫. サヤン山脈にスゲを訪ねて,すげの会会報 5(1994) 1-11.
[2] 清水建美. 原色新日本高山植物図鑑 (II), 保育社 (1983).
[3] 増沢武弘. 高山植物の生態学, 東京大学出版会 (1997).
[4] 井尻正二 (編著). 大氷河時代, 東海科学選書, 東海大学出版会 (1979).
[5] Peter. W. Ball, et al, Flora of North America Vol. 23, Cyperaceae (2002) Oxford, pp. 1- 608.
[6] L. I. Malyschev, G. A. Peschkova, Flora of Siberia, Cyperaceae 3 (1990) 1-277.
[7] An. A. Fedorov, et al., Flora of Russia, The European Part and Bordering regions Vol. II, Angiospermae (1976) Leningrad, pp. 1-323.
[8] S. M. Walters et al., Flora Europaea Vol. 5 (1980) Cambridge Univ., pp. 276-323.
[9] 環境庁自然保護局, 自然環境保全基礎調査, 植物分布・生育地類型表（1987）カヤツリグサ科, 245-257.
[10] 前川文夫, 植物の進化を探る（1969）岩波新書.
[11] 藤田至則, 日本列島の成立（1973）築地書館.
[12] 湊　正雄, 日本列島の歴史, 新地学教育講座 8（1976）東海大学出版会.

実験用海底基盤の制作と設置および応用研究について

土屋泰孝[1]

筑波大学 研究協力部研究協力課（下田臨海実験センター）

〒415-0025 静岡県下田市 5-10-1

概要

静岡県下田市大浦湾の水深 10m に海中実験用の海底基盤が設置されている。この海底基盤は設置後既に１０年以上を経ているにも関わらず、安定した状態で維持されており、これまでに下田臨海実験センターにおける海洋生態学の研究活動に有効に利用されてきた。

１．はじめに

近年の SCUBA 潜水の普及には目覚ましいものがあるが、研究調査における SCUBA 潜水は、標本採集や行動観察を目的としたものが主体である。潜水を行って種々の操作実験を行えば多くの新知見を得ることを期待できるが、実際には長期にわたって現場実験を行うような研究活動はほとんど行われていない。これは、海洋という環境において長期間安定して利用することが可能な調査基地の設置と維持が困難なためである。実験のための海底基地を設置したとしても、波浪の影響で倒壊したり地形変化のために埋没してしまったりすることが多い。巨大な構造物を設置すればこれらの問題は解決できるが、大学の研究機関にとって、そのような大規模構造物の構築とその維持管理は経費から言っても労力から考えても、現実的なものではない。

下田臨海実験センターでは、海底実験用のコンクリート基盤を鉄パイプフレームの上に固定したものを波浪の影響を受けにくい水深に設置することで、これらの難点を解決し、１０年以上に渡って実験用海底基盤を維持してきた。ここでは、この実験用海底基盤の概要とこれを利用して行われてきた研究の成果について報告する。

２．海底人工基盤について

海底に設置する人工基盤の調査観察としては、魚礁や藻礁などの設置後経過を調べることが、しばしば行われる[1]。基盤自体に着生してくる生物の経時的変化を調査することが、この場合の主目的である。しかしながら、海中での操作実験のための海底基盤を設置し、いわば「海底基地」として維持しながら、そこで実験を行うということは、ほとんど行われていない。設置場所や設置方法、維持管理に困難が伴うことがその主因であろう。下田臨海実験センターで行ってきた手法は条件の似通った他所でも有用であろうと思われる。その詳細を次に述べる。

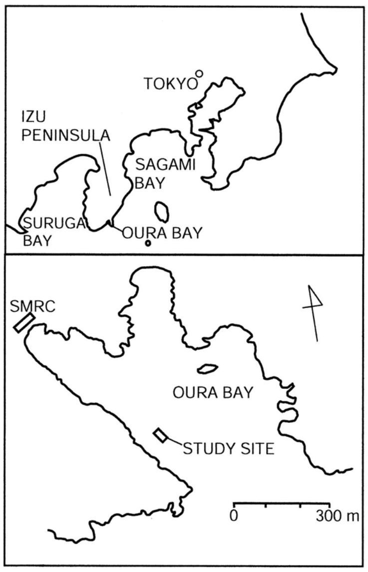


図１．海底基盤の設置場所
SMRC：下田臨海実験センター
STUDY SITE：設置場所

３．設置場所

静岡県下田市大浦湾の南西部の水深約 10m の地点に海底基盤が設置されている（図１）。大浦湾の西岸に位置する狼煙崎の岩礁から、沖に向かって漸次的に水深が増し、やがて岩礁が砂底に移行してゆく。この岩礁底と砂底の境界域付近の水深が約 10m で、大浦湾の湾口部までの最大水深にほぼ等しい。この地点は湾内にあって作業を行うのに安全な地点でありながら潮通しもよく、かつ水深が十分に深いために台風時にも波浪の影響を受けにくい。

岩礁地帯は基盤がしっかりしている半面起伏が大きく、広い設置場所の確保を行いにくい。一方、砂底は砂の流動の影響で不安定になりやすく、また、浮泥の堆積も起こりやすい。岩礁底と砂底の境界領域では、この両域の欠点が解消されるため、基盤が安定しているうえに広く平坦な設置場所を確保しやすいのである。この海底の、狼煙崎の海岸線に沿う北西から南東方向に４基１列の海底基盤を３列、合計１２基設置した（図２）。

[1] E-mail: tsuchiya@kurofune.shimoda.tsukuba.ac.jp
http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/

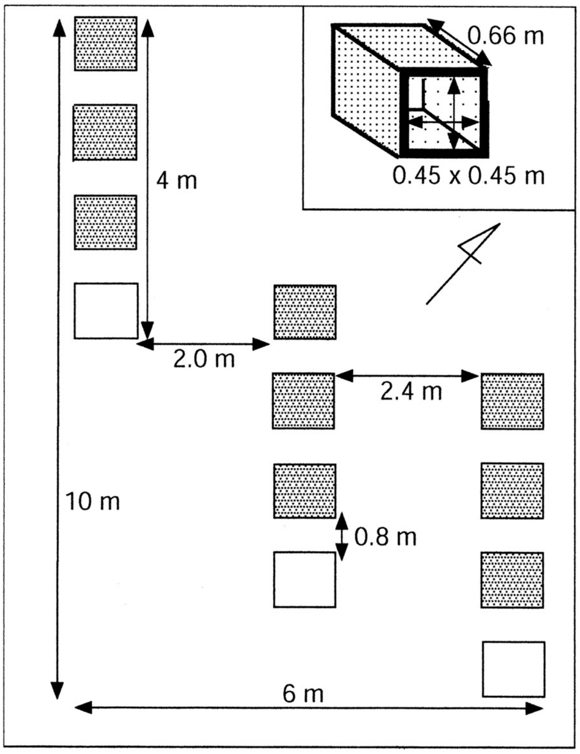


図２：海底基盤の配置
正方形が１個の基盤を示す. 白抜きのものが最も南東側に位置する.

４．基盤の構造と設置方法

4.1 構造

海底基盤の単体は、外形のサイズが幅 535mm、高さ 535mm、奥行き 330mm の直方体筒状コンクリートブロックを２個接続して、上面サイズを縦 660mm 横 535mm の長方形にしたものである。中空部の内径は幅 450mm、高さが 450mm である（図３）。

基盤固定用フレームの材料としたのは、外形が 50mm の鉄パイプである。長さ 500cm の鉄パイプ２本の間に長さ 120cm の鉄パイプを 11 本渡して固定し、そのうち 3 本は枠の固定用、8 本は基盤ブロックの支持用とし、2 本を 1 組として 4 基の基盤の支持フレームとした。さらに、120cm の鉄パイプ 2 本を基盤ブロックの筒状部の下部に通し、これを支持フレームに接続する事によって、基盤ブロックを固定した。鉄パイプフレームの上にコンクリート基盤４基が固定されたこの構造物を、設置の際の１ユニットとした。（図４）

4.2 設置方法

コンクリート基盤 4 基が固定された鉄パイプフレームを、陸上において 3 ユニット組み立てた。これに各々 8 個のブイを取り付けた後に、順次海岸に運び海に入れた。それぞれのユニットは、海面下に垂下された状態で順次原動機付きボートにて曳航し、設置場所直上の海面まで移動した後に、ブイに取り付けたロープを緩めながら、基盤ユニットをゆっくりと海底に向けて降ろした。海底で待機していた SCUBA 潜水者が、これを海底に固定した。これらの作業を 3 回繰り返し、それぞれ 4 基の基盤を載せた基盤ユニット 3 基が固定された。これにより、12 基の海底基盤が設置された。海底におけるそれらの配置を図２に示す。

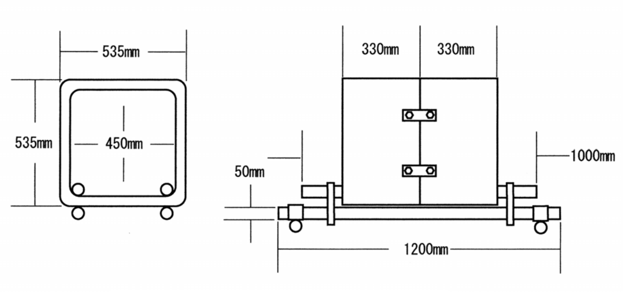


図３：海底基盤の側面図

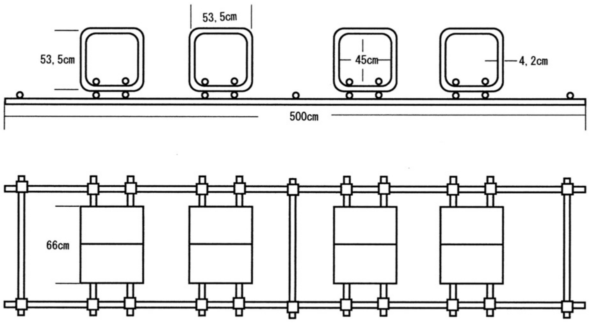


図４：海底基盤の設置配列

５．これまでの研究

5.1 カジメの研究

これまで下田臨海実験センターで、この海底基盤を利用して行われてきた最も主要な研究は、コンブ目の大型褐藻類であるカジメの生態についての研究である。海洋の沿岸域にはいろいろな種類の藻場があるが、カジメ類が高密度に生育して構成する「海中林」は、アワビやサザエなどの生育場所、また魚類の成魚および幼稚魚の隠れ場や餌場として、水産学的にも大変重要である。近年藻場造成についての基礎的研究が多く行われている。しかし、自然状態の海藻群落は、生育する環境条件にばらつきがあったり生育密度が異なっていたりするために、条件を揃えてデータを取ることが大変に難しい。

海底面から約 60cm の高さにある海底基盤の上面を利用したカジメの移植技術が開発されたことによって、カジメの任意の場所への移植が大変に容易になった[2]。この技術を利用して、カジメの幼体を一定密度になるように移植し、長期間にわたってこの計測を行うことによって、カジメの生長期や生長速度、外部から移植したカジメが環境により受ける影響、

などのデータが蓄積されてきた[3,4]。これらのデータを活かした研究によって博士の学位を取得した学生もいる[5]。

これまで、カジメの第1期試験移植では、6年間にわたる生長データがとり続けられた。現在は第 2 期の試験移植による生長データがとり続けられており、このデータは同地点での環境観測データと合わせた長期データとして、今後環境モニタリング等にも利用されていく見込みである。

図５：海底基盤上に移植されたカジメ

5.2 イソバナの研究

海底基盤の利用可能部分は上面のみではない。内部に空洞部分があるので、内側をも利用することができる。上面の裏側部分を利用して行われたのがイソバナを材料として行われてきた研究である。イソバナは八放サンゴ類の枝状ソフトコーラルで、潮下帯岩礁域の岩礁の垂直面やオーバーハングした岩礁の裏側に着生する。海底基盤の裏側部分は、このような岩礁域と環境条件が似ており、海水の流通もよいために利用可能であった。採集してきた天然のイソバナを海底基盤の上面裏側に移植することにより、イソバナ群体の長期にわたる経過観察が可能となった。この方法には、天然状態と異なり任意の部位に任意の密度で生育させることができる利点がある。この移植手法により 5 年以上にわたる潜水操作実験が行われ、イソバナ上に住む動物の生態解明に役立てることができ、この研究により修士学位の取得を行い、今年度中には博士の学位を取得予定の学生もいる[6]。

６．今後の展望

10 年以上にわたって維持されている海底基地は、下田臨海実験センターの財産であると言える。海底基盤を用いれば、短期的な海中操作実験を様々に行うことができ、今後多様な形でそのような利用が望まれる。一方、環境変化の長期モニタリングのためのサイトとしての利用可能性も忘れてはならないだろう。試みとしてここに自記水温計が設置されてから、まもなく５年が経過する。今後水温のみでなく多種のデータをこの海底基地において収集し、下田沿岸環境変化のひとつの指標として用いていくことも考えていきたいものである。

参考文献

[1] 芹澤如比古, 大野正夫. 土佐湾の外海域に設置した人工礁上に着生する海藻類の遷移, 日本水産学会誌 61(1995) 854-859.

[2] 平田徹, 青木優和, 倉島彰, 植田一二三, 土屋泰孝, 佐藤寿彦, 横濱康繼. 海中造林のための接着剤を用いたカジメ藻体の移植, 藻類 45 (1997) 111-115.

[3] Y. Serisawa, M. Aoki, T. Hirata, A. Bellgrove, A. Kurashima, Y. Tsuchiya, T. Sato, H. Ueda and Y. Yokohama, Growth and survival rates of large-type sporophytes of *Ecklonia cava* transplanted to a growing environment with small-type sporophytes, Journal of Applied Phycology 15 (2003) 311-318.

[4] Y. Serisawa, Y. Yokohama, Y. Aruga and J. Tanaka. Growth of *Ecklonia cava* Kjellman (Laminariales, Phaeophyta) transplanted to a locality with different temperature conditions, Phycol. Res. 50 (2002) 193-199.

[5] Y. Serisawa, Comparative study of *Ecklonia cava* Kjellman (Laminariales, Phaeophyta) growing in different temperature localities with reference to morphology, growth, photosynthesis and respiration, Ph.D. thesis, Tokyo University of Fisheries, 1998, pp. 1-133.

[6] 熊谷直喜. イソバナ類に生息するヨコエビ *Pleusymtes symbiotica*（端脚類：テングヨコエビ科）の個体群維持, 筑波大学大学院博士課程修士（理学）学位論文, 2001, pp. 1-39.

技術報告

情報環境の整備と改善

筑波大学生命・情報等教育研究支援室（社会工学系）
川上彰、北原匡、北原その美
〒305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

平成１５年度社会工学系技官研修として「情報環境の整備と改善」というテーマでグループ研修を行った。ここでは、その研修の成果を報告する。

１．はじめに

今年度は、「計算機室での印刷数の管理」、「無線 LAN 環境の構築」、「NetBoot による Macintosh の管理」の３つについて、環境の整備及び改善を行った。

２．計算機室での印刷数の管理

計算機室利用者の印刷枚数は年々増加する傾向にある。このため、詳細な印刷状況を把握するとともに、予め設定した印刷枚数を超えた利用者に使用量を通知することにより、全体使用量を押さえることを目的として本システムを作成した。

2.1 印刷ログの収集

社会工学類の３つの計算機室には合計６台のネットワークプリンタが設置されている。６台のプリンタから印刷された内容は、富士ゼロックス社の DocuHouse 履歴サービスという市販のソフトを使って Windows2000Server 上に収集される。各プリンタは、印刷時にユーザ名や枚数等をプリンタ内に記録し、DocuHouse が定期的に各プリンタの情報を収集する。

2.2 ログ情報の転送

UNIX サーバ上で各種の処理を行うため、Windows2000Server 上の印刷ログを UNIX サーバへ転送する。転送には UNIX サーバ上に smbclient プログラムを使ったシェルスクリプトを作成し、これをクーロンジョブとして定期的に実行することとした。この概要を図 2-1 に示す。

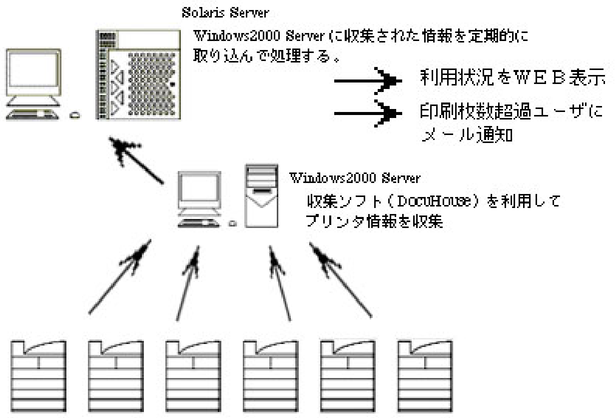


図 2-1 ログ収集の概要

2.3 データベース化

UNIX サーバに転送されたテキストベースの情報の内、以下の内容を取り出してデータベースに追加する。データベース機能は、MySQL を使って構築した。

- ユーザＩＤ
- 印刷日時
- 印刷枚数
- 印刷先（プリンタ名）
- 印刷タイトル

2.4 集計結果の表示とユーザへの通知

データベース内のデータを集計し、以下のように処理した。

(1) CGI プログラムにより、月別、曜日別、プリンタ別に集計し WEB 表示する。結果は図 2-2 のように表示される。

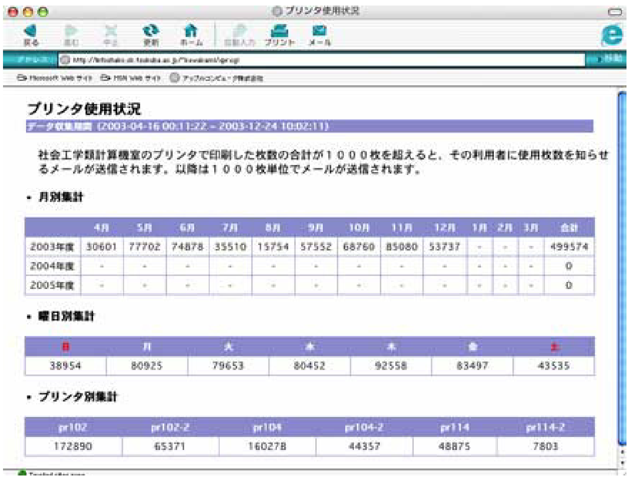


図 2-2 印刷結果の集計結果

(2) クーロン・ジョブで１日１回、夜間にチェックして設定枚数を越えた利用者にメールを送る。プログラム内には警告を出す際の印刷枚数の初期値と増分が指定されている。印刷枚数が初期値を超える利用者の内、以前に警告が送られていない者にはメールを送る。また、既に送られている利用者の場合は、以前にメールを送った際の印刷枚数と今回の枚数との差が設定された増分値より多い場合は、メールを送信する。

３．無線ＬＡＮ環境の構築

3.1 IEEE802.1X による認証

無線 LAN によるアクセスは非常に便利ではあるが、不特定多数の利用者に無制限に公開することは管理上問題がある。そこで、IEEE802.1X による認証機構を取り入れることにより、事前に許可された利用者のみがネットワークを使用できる環境を構築した。

(1) 構成

ネットワーク構成図を図 3-1-1 に示す。NAT ルータを使って既存のネットワークと無線 LAN 環境を分け、NAT ルータの DHCP サーバ機能を使ってパソコンにプライベートな IP アドレスを与える。また、無線 LAN のアクセスポイントは、IEEE802.1X に対応した製品であり、Radius サーバと交信して認証を行う。Radius サーバ用のソフトウェアとしては FreeRadius を使用した。

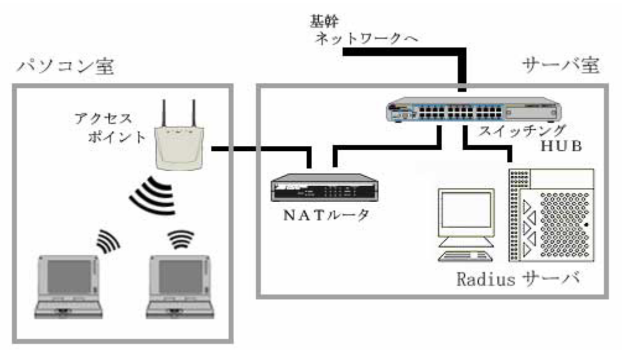


図 3-1-1 ネットワーク構成図

(2) 認証プロトコル

IEEE802.1X では EAP 認証方式が使われるが、これにも幾つか認証方法がある。今回は、Windows XP と MacOS X(バージョン 10.3 以降) で標準でサポートされている EAP/TLS 方式を利用した。EAP/TLS 方式は公開鍵認証を利用し、パソコンと Radius サーバとの間で相互に証明書を交換して認証を行う。ここで利用したパソコンとサーバの証明書は自己署名型の Root 認証局を構築し、これを使って各々の証明書を発行した。この方式の特徴としては、ネットワークへの接続には利用者の ID やパスワードをその都度入力する必要はなく、パソコンにインストールされた証明書を使って行われる。

(3) 利用者の証明書発行

証明書の発行は、OpenSSL のツールを使って行うことができる。ただし、証明書発行のためのコマンド入力やサーバで作成された証明書のパソコンへのコピー等、煩わしい操作を行わなければならない。これを簡単にするため、ＷＥＢ上で証明書の発行ができるシステムを作成した。

図 3-1-2 に示すＷＥＢページで NIS サーバに登録されている個人 ID とパスワードを入力すると、証明書と秘密鍵の入ったファイルと Root 認証局の公開鍵ファイルの２つのファイルを作成し、ブラウザに表示する。これを利用者のパソコンにダウンロード、インストールして利用する。利用者の秘密鍵が他人に利用されることを防ぐため、以下のような対策を講じた。

(a) 利用中のパソコン以外のブラウザからのアクセスを防ぐために、http のアクセス制限設定を自動的に行う。

(b) ファイルが作成されるディレクトリは、ＷＥＢサーバと管理者以外はアクセスできないようにパーミッション設定した。

(c) 認証用のファイルが作成されたディレクトリは、作成後２０分で自動的に削除される。

(d) 個人用の証明書と秘密鍵入ったファイルに、そのユーザのパスワードを設定し、他人が利用できないようにした。

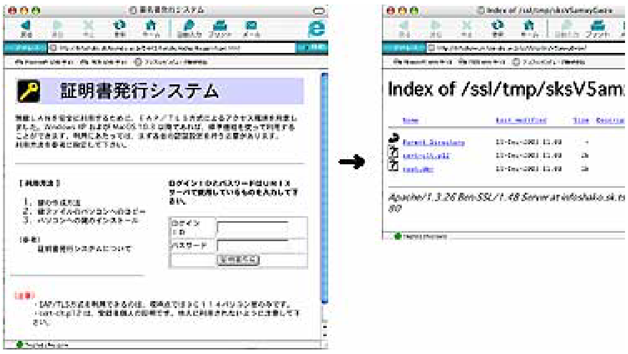


図 3-1-2 証明書の発行

(4) テスト結果

表 3-1-1 に示す機器を使用してテストを行った。クライアントとしては、Windows XP のインストールされたパソコンを使用した。クライアントとしてパソコン１台のみを使用したテストではあるが、通常の状態では問題なく使用できた。ただし、サスペンドやレジューム状態になると、その後再接続することができなかった。パソコンとアクセスポイントとの間の接続に問題があるようであるが、原因の特定はできていない。これを回避するために利用者のパソコンをレジュームやサスペンドしない状態に設定して利用することとした。

Macintosh については機器の調達ができず、残念ながらテストできなかった。

表 3-1-1 使用機器

	機器＆ソフト
Radius サーバ	GP7000S model45,Solaris 8 FreeRadius,Ver.0.9.3
アクセスポイント	Aironet 1220B (CISCO)
パソコン 無線ＬＡＮカード	DELL INSPIRON 8000 WLI-PCM-L11GP (BUFFALO)
NAT ルータ	BA 5000 PRO (NTT-ME)

3.2 無線 LAN を含んだ情報環境整備の一例

社会工学系資料室[1]は、中央図書館[2]の分室としての性格上、図書・雑誌等資料の貸借およびそれに係わる経理業務の仕組みが非常に複雑である上に、その殆どを担当者の手作業で行っていた。また、利用者は、目的の資料を得るため「ネットワーク環境の整った別の場所で」「事前に」OPAC[3]で検索した上で、資料室を訪れていた。そこで、利用者、管理者両側面の視点より、以下の３項目について整備を行った。

(1) 無線 LAN 環境の整備

資料室内での無線 LAN 環境を整え、利用者の利便性向上を目指す。ここでは、「セキュアなネットワーク」と同時に「利用者、管理者双方にとって簡易な使い勝手」を考慮する。

一般的なセキュリティ対策としては、

■SSID の設定により SSID を知らないユーザーの接続を阻止する
■AP に MAC アドレス(Media Access Control Address)を登録し、登録したもの以外の接続を拒否する
■無線を通じてやりとりされる内容を暗号化し、傍受されても内容が分からないようにする（WEP 暗号化）

等が有効とされてはいるが、何れも解析可能であり不確実性は否めない。

そこで、RADIUS 認証方式（3.1 参照）を導入し、よりセキュアなネットワークを構築する。但し、ここでは、AP に、AirMacExtremeBaseStation（認証ＩＤとして MAC アドレスを採用、NAT ルータ機能含）を使用する（図 3-2-1）。

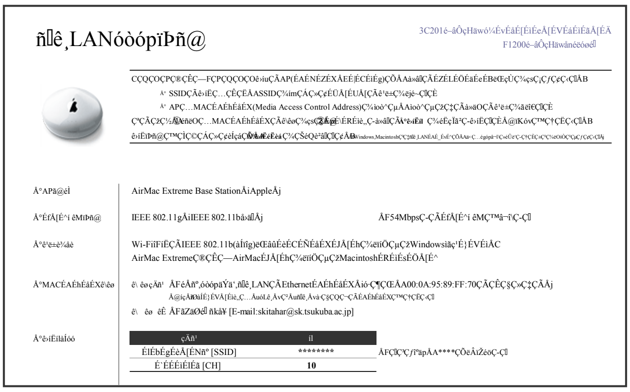


図 3-2-1 無線 LAN（AP 仕様）

さらに目的の一つである「簡易な使い勝手」として、社会工学類プレゼンテーション室（2003 年 9 月より開室）との一元的管理運用を目指す。即ち、ユーザーは一度の MAC アドレス申請のみで、管理者は RADIUS サーバへの一度の登録のみで、両システムが利用可能となる。尚、同システムは、

■MacOS [PowerBook,iBook,iMac_Apple]
■WindowsXP [Latitude_Dell,VAIO_Sony]
■PalmOS [CLIe_Sony]

で動作確認済み、若しくは稼働中である。

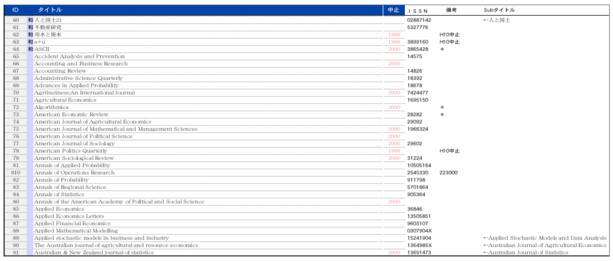
(2) 所蔵資料のデータベース構築

既存の OPAC との使い分け、即ち機能および登録件数を縮小することによって、容易に目的の資料情報を得られることを第一の目的とする。そのため、所蔵資料を大分し、種類別データベース（アプリケーション：FileMaker）を作成する。学系予約雑誌目録、寄贈図書、Discussion Paper に関しては、web 公開し、利便性の向上を図る（図 3-2-2）。

図 3-2-2 データベースの web 公開

(3) 業務の効率化

まず、マスタファイルとして、過去１０年間社会工学系経費で購入した全雑誌データ「雑誌マスタ」（図 3-2-3）を作成し、年度毎に見直される購入継続・中止および新規購入状況を把握することにより、年度別雑誌目録「年度データ」（図 3-2-4）の情報を得る。(2)の予約雑誌目録も、この学系購読雑誌 D.B システム中の一機能である。



［データ項目］ ID：学系雑誌識別番号　区分：和/洋
タイトル：雑誌名　中止：中止年度
備考：個人購読等　ISSN：共通
Sub：継続・変更誌名

図 3-2-3 雑誌マスタ

[1]概要　http://infoshako.sk.tsukuba.ac.jp/~tosho/
[2]筑波大学電子図書館　http://www.tulips.tsukuba.ac.jp/
[3]学内蔵書検索　http://www.tulips.tsukuba.ac.jp/opac.html

「年度データ」に、i)図書館からの新着・返却情報を設定することにより（図 3-2-5）、資料室に所蔵されている学系購読雑誌の最新現況や延滞状況が把握可能となる。

ID	区分	タイトル	中止	申請見積	概算 02/3/	予算見積 02/5/	積残00	必要経費01	積残01	使用替 02/6/	Vol	更新日	購入学系等 図書館	学系等	筑波外	重複貸出
59	和	ビジネス レビュー	2000	0	0	0				0					大塚	
60	和	人と国土21		5,780	5,292	5,292				5,292	28巻3号	2002.10.		農工		
61	和	不動産研究		4,920	4,680	4,680				4,680	44巻4号	2002.10.				
62	和	用水と廃水	1998	0	0	0				0						
63	和	a+u	1998	0	0	0				0				芸術		
64	和	ASCII	2000	0	0	0				0			中図	加セ 水セ	大塚	
65		Accident Analysis and Prevention		143,170	146,260	146,260				146,260	Vol.34 No.6	2002.11.				
66		Accounting and Business Research	2000	0	0	0				0						
67		Accounting Review		19,488	23,026	23,026				23,026	Vol.77 No.4	2002.11.			大塚	
68		Administrative Science Quarterly		15,834	17,608	17,608				17,608	Vol.47 No.2	2002.11.			大塚	
69		Advances in Applied Probability		26,271	29,326	29,326				29,326	Vol.34 No.3	2002.11.		数学 電情	大塚	+(電
70		Agribusiness:An International Journal	2000	0	0	0				0				農林		
71		Agricultural Economics		75,910	77,450	77,450				77,450	Vol.27 No.2	2002.8.2		農林		
72		Algorithmica	2000	0	0	0				0			中図			
73		American Economic Review		17,052	20,317	20,317				20,317	Vol.92 No.3	2002.8.2	中図	農林 社会	大塚	
74		American Journal of Agricultural Economics		23,793	31,846	31,846				31,846	Vol.84 No.3	2002.8.2		農林		
75		American Journal of Mathematical and Management	2000	0	0	0				0				数学		
76		American Journal of Political Science	2000	0	0	0				0						
77		American Journal of Sociology	2000	0	0	0				0				社会 体育		
78		American Politics Quarterly	1998	0	0	0				0						
79		American Sociological Review	2000	0	0	0				0				社会		
81		Annals of Applied Probability		13,398	13,545	13,545				13,545	Vol.12 No.3	2002.10.		電情		
810		Annals of Operations Research		195,174	240,513	240,513				240,513						
82		Annals of Probability		19,488	21,672	21,672				21,672	Vol.30 No.3	2002.9.1		電情 数学	大塚	
83		Annals of Regional Science		35,899	44,887	44,887				44,887	Vol.36 No.2	2002.9.3				
84		Annals of Statistics		21,924	24,381	24,381				24,381	Vol.30 No.4	2002.10.		数学	大塚	
80		Annals of the American Academy of Political and Social	2000	0	0	0				0						
85		Applied Economics		150,297	173,376	173,376				173,376	Vol.34 No.15	2002.11.				
86		Applied Economics Letters		85,260	173,376	173,376				173,376	Vol.9 No.12	2002.10.				
87		Applied Financial Economics		54,810	69,751	69,751				69,751	Vol.12 No.10	2002.11.				
88		Applied Mathematical Modelling		145,120	148,320	148,320				148,320	Vol.26 No.11	2002.11.		数学		
89		Applied stochastic models in business and industry		121,191	147,640	147,640				147,640	Vol.18 No.3	2002.10.				
90		The Australian journal of agricultural and resource		24,517	30,439	30,439				30,439	Vol.46 No.3	2002.9.3				
91		Australian & New Zealand journal of statistics	2000	0	0	0				0				数学		

［データ項目］　ID, 区分, タイトル, 中止：雑誌マスタ参照
申請見積：過去の実績による参考額
予算見積：学系予算申請時計上額
概算：契約見積額（図書館通達）
積残 1：前年度繰越使用替額（〃）
積残 2：前年度以前繰越使用替額（〃）
必要経費：前年度繰越支払額（〃）
使用替額：当年度使用替額（〃）
更新日：最新受入日
Vol：最新号
重複学系：同誌購入他学系
重複貸出：新着期間後資料室保管

図 3-2-4 年度データ

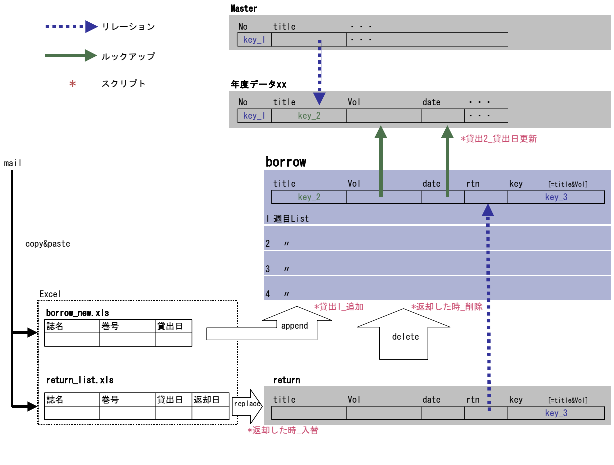


図 3-2-5 データフロー（新着雑誌）

実際の作業手順は、上記のデータフローの概念図とともにマニュアル化し（表 3-2-1）、担当者の理解を得る。

表 3-2-1 作業手順（新着・返却）

1) borrow_new.xls(Excel)を開き「すべてを選択」「削除」
2) mail から data を copy、セル A1 に paste
3) マクロ[データ読込]を起動　◆+op+r
4) 保存終了
5) return_list.xls(Excel)を開き「すべてを選択」「削除」
　同様に 2)3)4)
6) return(FM)を開き、スクリプト[返却した時_入替]を起動
7) borrow(FM)を開き、[返却した時_削除]を起動
8) 続けて、[貸出 1_追加]を起動
9) 年度データ xx(FM)を開き、[貸出 2_貸出日更新]を起動
　FM 終了

また、ii)図書館より通知された学系購読雑誌の概算価格を組み込むことにより、予算案作成時における雑誌費の見積額（年度データ：予算見積）がより正確となる。
さらに、iii)実際の使用替額を組み込むことにより、次年度予算案作成時における見積額の補填的データとしても有効となる。これらの作業手順についても、マニュアル化し（表 3-2-2）担当者のガイドとする。

表 3-2-2 作業手順（使用替）

図書館より「雑誌購入費の使用替について」の通知がきたら…

	手順
1	図書館より使用替リストのファイルを入手
2	データを年度毎に別ファイルに保存
3	年度データファイルに「リレーションの定義」を設定
4	「フィールドの定義」で使用替リストのデータを参照
金額が合わない場合は．．．	
5	「使用替リストの誌名」と「年度データのタイトル」が一致していることを確認
違っている場合は．．．	
6	「雑誌マスタのタイトル」を「使用替リストの誌名」に変更

D.B システムとしては非正規形にならざるを得ないデータ構造を持つ業務内容のため、完全定型化を敢えて避け、作業行程を幾つかに分けたオブジェクト単位での自動化にとどめ、システム全体に柔軟性を持たせる。このことは同時に、実際の担当者が、単純なオペレーションの繰り返しとならず、業務内容に対する理解を深めるためにも有益となる。
また、このシステムの実現には、従来図書館より文書の形で通達されていた情報の「デジタル形式による入手」が前提となる。事務文書全般を通じて徐々にデジタル化の方向にはあるが、新着・返却リスト等通常の手続きとは別に、図書館担当者の方の協力を必要とする部分も残る。
このような組織間の連携性は、業務の効率化を考える上で、重要な課題の一つであると考える。

４．NetBoot による Macintosh の管理

4.1 NetBoot システムの概要

Mac OS X Server で標準提供されている NetBoot 機構を用いることにより、各クライアント Macintosh はローカル HDD から起動するのではなく、ネットワーク経由で NetoBoot サーバに保存されているディスクイメージから起動する。管理する側からみると、サーバ上の一つのディスクイメージのみを保守管理すれば、全てのクライアント Macintosh に同等の環境を提供することができ、OS やアプリケーションのアップデートをクライアント台数分適用する煩わしさはなくなる。また、クライアントに障害が起きたとしても再起動するだけでよく、再インストール、再設定等の作業が不要になる。この方法で数カ月運用して特に問題はない。

本報告では、当研究科での NetBoot システムの構成と設定手順を紹介する。

4.2 システム構成

図 4-1 に示す本システムは､以下のような構成とする。

4.2.1 クライアントパソコン

- iMac 400MHz/512MB 4 台
- Mac OS X 10.2.8 を NetBoot させる
- 研究科サブネットに接続し、既存の DHCP，DNS サービスを利用する
- ユーザ認証は社会工学類計算機システムの NIS を利用する
- ユーザディレクトリは社会工学類計算機システムの NFS を利用する

4.2.2 NetBoot サーバ

- MacintoshServerG4 733Mhz/1GB
- Mac OS X Server 10.2.8
- 研究科サブネットに接続し、既存の DHCP および DNS サービスを利用する
- NetBoot サーバ機能のみ稼働させる

図 4-1 システム構成

4.2.3 DHCP サーバ

- 研究科サブネットにある既存の DHCP(MAC アドレスによる静的 IP 割当)

4.2.4 ネットワーク

- 研究科サブネットに接続し、既存の DHCP，DNS サービスを利用する
- 筑波大学キャンパスネット下の単一の研究科サブネットを利用し､NetBoot 用に新たにローカルサブネットは作らない。

4.3 NetBoot システムの設定と起動

本システムの設定手順は以下の通りである。

4.3.1 ディスクイメージの作成

- 雛形システムの設定

1. 任意の Macintosh（クラアント iMac と同一ハードが望ましい）上にテンプレートとなるシステム（OS，アプリインストール，基本環境設定含む）を管理者権限で構築する。当然の事ながら、NIS および NFS の設定もここで行い､動作確認をしておく。（本報告では､NIS, NFS の設定は省略する）
2. 新たに雛形ユーザを登録し利用環境を設定する。（user 名を tempuser と仮定）「4.4.1 ユーザの利用環境の設定」を参照。
3. NetBoot 時にクライアントの「コンピュータ名」および「Rendezvous 名」を DNS 上のホスト名に自動設定するために、処理パッケージを /Library/StartupItems に埋め込む。「4.4.2 コンピュータ名の設定」を参照。
4. /etc/hostconfig に "COMPUTERNAME=-YES-" のエントリーを追加する。

- イメージ作成

5. 外付けのディスク（FireWireHDD 等）を接続し、空の任意のパーティション(MacIMG とする)をマウントする。
6. Disk Copy を起動し､「ファイル｣メニューから｢新規」を選び、次にサブメニューから「フォルダまたはボリュームのイメージ」を選び、起動ボリュームを選択する。
7. 「イメージ｣をクリックし､「ボリュームのイメージ作成」パネルでイメージ名（起動ディスクボリューム名）を入力し、作成先として外付けディスクのパーティションを選択し「イメージフォーマット」のポップアップメニューから「読み込み／書き込み」を選択する。
8. 「保存」をクリック。イメージ作成には長時間を要する。
9. Disk Copy で、作成したイメージファイルのイメージサイズを増やす。概ね元サイズの２倍を目安にする。
10. 「ターミナル」（/Applications/Utilities）を起動し､以下のコマンドを入力。
    #kextcache -l -n -m
        /Volumes/MacIMG/mach.macosx.mkext
        /System/Library/Extensions
11. 外付けディスクをアンマウントし外す。

- NetBoot イメージ設定

12. サーバに外付けディスクを接続しマウントする。
13. ターミナルで /Library/NetBoot/NetBootSP0/MacHD.nbi ディレクトリを作成する。

14. 作成したイメージ MacHD.dmg と mach.macosx.mkext ファイル を上記ディレクトリにコピーする。
15. MacHD.dmg ファイルをダブルクリックしてデスクトップ上にマウントする。
16. 以下のコマンドを入力。
    # cd /Library/NetBoot/NetBootSP0/MacHD.nbi
    # cp /Volumes/MacHD/usr/standalone/ppc/bootx.bootinfo booter
    # cp /Volumes/iMacHD/mach_kernel mach.macosx
17. 以下のプロパティーを NBImageInfo.plist という名称で作成。
    - BootFile, String, booter
    - Index, Number,（任意の整数）
    - IsDefault, Boolean, Yes or No
    - IsEnabled, Boolean, No
    - IsInstall, Boolean, No
    - Name, String,（イメージ名。この場合 MacHD）
    - RootPath, String,（イメージファイル名。この場合 MacHD.dmg ）
    - Type, String, NFS

4.3.2 NetBoot サーバの設定と起動

NetBoot イメージを選択(MacHD.dmg)し、デフォルトイメージとし、NetBoot サーバを起動する。

4.3.3 クライアントの起動

クライアントの電源オン時に、同時に n キーを押したままにすると、自動的にネットワークイメージを検索して、NetBoot する。Apple Remote Desktop を用いると、再起動等の一括制御が可能になるので更に管理しやすくなる。

4.4 利用環境の設定

4.4.1 ユーザの利用環境の設定

はじめて Macintosh にログインするユーザは、その利用環境（言語設定や、ファインダーの設定、Dock へのアプリケーション登録等）はシステムの初期設定になっている。それらは手作業で個人毎になされるべきものではあるが、研究科に特化した環境を簡単に初期設定するための図 4-2 のようなアプリケーション(InitEnv.app)を Project Builder を用いて作成した。このアプリケーションは、あらかじめ作成された雛形ユーザ（tempuser）の利用環境情報を各ユーザのホームディレクトリ内の各種設定ファイルに上書き保存する。この操作はユーザが任意で一度だけ実行可能である。

雛形となるローカルユーザ（tempuser）が設定した動作環境を tar でまとめて保管する図 4-3 のシェルスクリプトを作成し、LogoutHook として登録する。登録は以下のコマンドを用いる。

defaults write com.apple.loginwindow LogoutHook /Library/Management/logout.sh

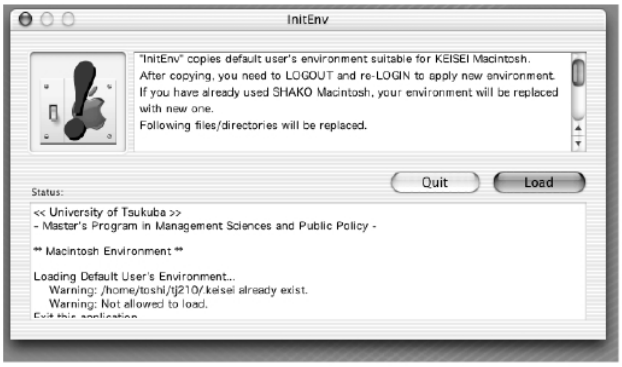


図 4-2 InitEnv アプリケーション

```
#!/bin/csh -f
## /Library/Management/logout.sh for LOGOUT HOOK
## $1: user name provided from login panel
## Make prototype resource file and InitEnv application
set TEMPUSER = tempuser
set TARDIST = /Users/Shared/TempRsrc
if ( ! -d $TARDIST ) then
  /bin/mkdir $TARDIST
  /bin/chmod 777 $TARDIST
endif
set RSRC = $TARDIST/TempUserRsrc.tar
set CMND = $TARDIST/InitEnv.tar
set APPDIR = /Applications
if ( "$1" == "$TEMPUSER" ) then
   cd ~$TEMPUSER
   /usr/bin/tar -cf $RSRC Library .CFUserTextEncoding .Trash
   if ( ! -e $CMND ) then
          cd $APPDIR
          /usr/bin/tar -cf $CMND InitEnv.app
   endif
endif
```

図 4-3 LogoutHook スクリプト

また、ユーザログイン時、既に環境設定されているかどうか検査し、未設定であればこのアプリケーションをユーザデスクトップ上にコピーするような図 4-4 のシェルスクリプトを LoginHook として登録する。登録は以下のコマンドを用いる。

defaults write com.apple.loginwindow LoginHook /Library/Management/login.sh

```
#!/bin/csh -f
## /Library/Management/login.sh for LOGIN HOOK
## $1: user name provided from login panel
## Copy InitEnv.tar to user's Desktop, and untar
set TEMPUSER = tempuser
set TARDIST = /Users/Shared/TempRsrc
if ( ! -e ~$1/.keisei ) then
   if ( "$1" != "$TEMPUSER" ) then
      if ( ! -e ~$1/Desktop ) then
         /usr/bin/sudo -u $1 /bin/mkdir ~$1/Desktop
      endif
      if ( -e $TARDIST/InitEnv.tar ) then
         /usr/bin/sudo -u $1 /bin/chmod 777 ~$1/Desktop
         /usr/bin/sudo -u $1 /bin/cp -f $TARDIST/InitEnv.tar ~$1/Desktop
         cd ~$1/Desktop
         /usr/bin/sudo -u $1 /usr/bin/tar -xf InitEnv.tar
         /usr/bin/sudo -u $1 /bin/rm -f InitEnv.tar
         /usr/bin/sudo -u $1 /bin/chmod 700 ~$1/Desktop
      endif
   endif
else
   /usr/bin/sudo -u $1 /bin/rm -Rf ~$1/Desktop/InitEnv.app
endif
exit 0
```

図 4-4 LoginHook スクリプト

図 4-5 は図 4-4 のスクリプトによってデスクトップ上に現れた InitEnv アプリケーションのアイコンである。

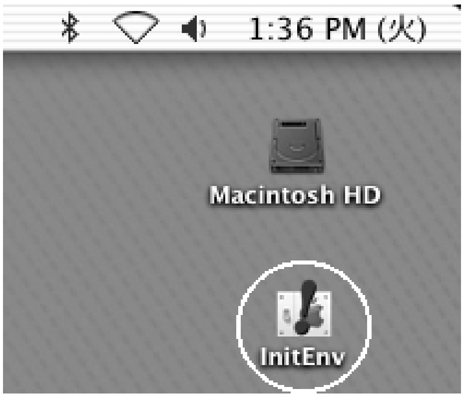


図 4-5 DeskTop 上の InitEnv アイコン

4.4.2 コンピュータ名の設定

一つのディスクイメージから起動するため、Macintosh 特有の AppleTalk 名（コンピュータ名）、Rendezvous 名はどのクライアントも同じになってしまう。図 4-6 のような Startup スクリプトを設定し、DNS 名で置き換えるようにした。

Resources/English.lproj/Localizable.strings

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE plist SYSTEM "file://localhost/System/Library/DTDs/PropertyList.dtd">
<plist version="0.9">
<dict>
		<key>Checking Computer Name</key>
		<string>Checking Computer Name</string>
		<key>Setting Computer Name</key>
		<string>Setting Computer Name</string>
</dict>
</plist>
```

StartupParameters.plist

```
{
 Description     = "Computer Name";
 Provides        = ("ComputerName");
 Requires        = ("Core Services","NetworkExtensions");
 OrderPreference = "Last";
}
```

ComputerName

```
#!/bin/sh
##
# ComputerName    by M.Kitahara
##
. /etc/rc.common
StartService ()
{
if [ "${COMPUTERNAME:=-NO-}" = "-YES-" ]; then
		ConsoleMessage "Setting Computer Name"
		prefdir="/var/db/SystemConfiguration"
		pref="preferences.xml"
		keyCN="\<key\>ComputerName\<\/key\>"
		keyHN="\<key\>LocalHostName\<\/key\>"
#		macad=`ifconfig en0 | grep ether | awk '{print($2)}'`
		atnam=`hostname | awk -F"." '{print($1)}'`
	cat ${prefdir}/${pref} | awk ' \
	/'"${keyHN}"'/ \
		{ printf("%s\n\t\t\t\t\<string\>%s\<\/string\>\n",$0,""$atnam"")
		getline vanish
		next } \
	/'"${keyCN}"'/ \
		{ printf("%s\n\t\t\t\<string\>%s\<\/string\>\n",$0,""$atnam"")
		getline vanish
		next } \
		{ print $0 }'  >| /tmp/CompName$$
		mv /tmp/CompName$$ ${prefdir}/${pref}
fi
}
StopService ()
{
return 0
}
RestartService ()
{
return 0
}
RunService "$1"
```

図 4-6 コンピュータ名設定スクリプト

4.5 ディスクイメージの更新

OS およびアプリケーションの新規インストール、アップデートはサーバ上の NetBoot ディスクイメージを変更するだけでよい。既存イメージの変更は２つの方法がある。

4.5.1 サーバ上で行う方法

ディスクイメージをマウントした後、所定のアップデータをそのボリュームに対して実行させ、

```
# cd /Library/NetBoot/NetBootSP0/MacHD.nbi
# vsdbutil -a /Volumes/MacHD
# kextcache -l -n -m mach.macosx.mkext
  /Volumes/MacHD/System/Library/Extensions
# cp
  /Volumes/MacHD/usr/standalone/ppc/bootx.bootinfo
  booter
# cp /Volumes/MacHD/mach_kernel mach.macosx
```

を実行することで可能である。この場合、環境の設定変更は GUI ではできないので、直接設定ファイル（preferences.xml 等）を編集する必要がある。

4.5.2 クライアント上で行う方法

サーバ上でイメージをマウント後、シェアウェアの Carbon Copy Cloner 等を用いて、外付けディスクの空パーティション上に全てコピーする。
クライアントマシンにその HDD を接続し、そのパーティションから起動する。通常のアップデート作業および、設定等を行い、外付けディスクを再びサーバに接続し、Carbon Copy Cloner 等でサーバ側にある元のイメージ（まだマウントしてあるはずの /Library/NetBoot/NetBootSP0/MacHD.nbi の MacHD.dmg）に戻す。そして以下のコマンドを入力。

```
# cd /Library/NetBoot/NetBootSP0/MacHD.nbi
# kextcache -l -n -m mach.macosx.mkext
  /Volumes/MacHD/System/Library/Extensions
# cp
  /Volumes/MacHD/usr/standalone/ppc/bootx.bootinfo
  booter
# cp /Volumes/MacHD/mach_kernel mach.macosx
```

4.6 本 NetBoot システムの現状

当研究科のクライアント Mac は４台であるため、研究科ネットにサーバとともに全て直接接続したが、クライアント台数が多い場合は、ネットワークおよびサーバの負荷を考慮すると、複数サーバに複数の NIC を装備しサブネットを構成して負荷分散をはかる必要がある。また、ディスクイメージを分散化させて配置する必要もある。概ねサブネットあたり十数台のクライアントが実用限度ではないだろうか。ただし、マシンやネットワークの能力が向上すればさらに多くのクライアントを処理できると考える。ちなみに Apple では最大２５台としている。
本システムでは、クライアント４台を同時に NetBoot

させた場合、マシンによってばらつきが出るが、約１分ー３分でログインパネルが出現し、利用可能状態になった。

今回のNetBoot構成は、shakoシステムのNISによるユーザ認証サービスおよび、NFSマウントによるユーザホームディレクトリサービスを受けるため、Apple推奨のシステムは構築しがたく、プロトタイプシステム上でそれらの設定を含む全ての設定を施し、アプリケーションソフトをインストールした上で、ディスクイメージを作成している。NetBootによる起動においても、それらは問題なく正常に動作している。ただし、当然のことながら、各アプリケーション等は、ネットワークライセンス等が必要で、Mac OS Xについてもクライアント数分のライセンスは必要である。

4.7 今後の課題

今後の課題として以下があげられる。

- イメージ作成、アップデート作業の際のコマンド操作の簡略化
- 学類Macと研究科Mac両方使うユーザに対して、Dockの自動切替の仕組み
- クライアントMacのディスクレス化の可能性
- NetBootサーバの負荷分散
- 既存DHCPサーバとの両立性の向上
- 他プラットフォーム上でのNetBootサービス

本システムはMac OS X 10.2.8 (Jaguar)をベースに構築されているが、運用試行および本報告作成中既にMac OS X 10.3.2および同Server (Panther)がリリースされている。この新OSでは、NetBootに関連する操作環境が著しく改善されており、本報告で用いた方法はもはや不要となっている部分も多い。また上に挙げた課題も解決されているようである。

今後はクライアントおよびサーバを10.3ベースにアップデートし、さらに操作性、機能性を向上させたNetBootシステムを構築したい。
また、ユーザ認証およびディレクトリサービスの面でも新たな効率の良い方法を検討する必要がある。

５．まとめ

印刷枚数の制限を行うことにより印刷量を約１４％削減することができた。また、印刷ログをデータベース化することにより、集計方法や利用者への対応方法等、柔軟な対応が可能となった。

認証機構を使った無線LAN環境の構築については、対応したハードウェアとソフトウェアが必要とされる。新たな規格も策定されているようで、今後更に環境も充実してくるものと思われる。そのような技術開発そのものが途上の中で、常によりセキュアなシステムを模索しつつ、少しでも使い勝手のよい環境を整備していくことが、研究・教育・事務各々にとっての効率化に有益であると考える。

Mac OS X 10.2.xでのNetBootシステムはまだ改善の余地はあるものの、小規模なMacintosh端末室等による運用では管理面および利用面双方において十分なメリットがあると言える。Mac OS Xのバージョンアップとともに、NetBootの機能は更に向上しているので、今後のシステム構築に積極的に導入することとしたい。

なお、この研修の内容については、ウェブページにも掲載されているので参考にして頂きたい。
(http://infoshako.sk.tsukuba.ac.jp/kenshu)

謝辞

研修にあたっては、「社会工学系技官研修経費」から補助を受けました。研修に御理解、御協力頂きました橋本社会工学系長に感謝いたします。

また、図書館部情報管理課各位には、種々のデジタル情報の提供依頼さらには細かなフォーマット修正の要求等に善処して頂きましたことに対し、厚くお礼申し上げます。

参考資料

[1] 日本MySQLユーザー会著："MySQL徹底入門", 翔泳社
[2] "Software Design" 2003年3月号第２特集 ゼロからはじめるMySQL, 技術評論社
[3] I/O 第１編集部："暗号攻略マニュアル", 工学社
[4] Mac OS X Server 管理者ガイド
[5] Apple Support Discussion Board
http://discussions.info.apple.co.jp/
[6] Apple Tech Info Library
http://til.info.apple.co.jp/
[7] Apple Mac OS X Server ドキュメンテーション
http://www.apple.co.jp/server/documentation/
[8] Apple ディレクトリサービスビジネスソリューションセミナー資料
[9] Apple Mac OS X Server 10.3 ハンズオンセミナー資料

イメージングアナライザーによる 表面汚染密度の測定実習の検証

筑波大学人文・数理等教育研究支援室
（アイソトープセンター）　　伊藤達夫

論文要旨
イメージングアナライザーは放射線に対し高い感度、潜像蓄積効果のある積分型２次元放射線検出器である。これを利用し放射線業務従事初心者講習会の実習「表面汚染の検査と除染」で使用されている汚染試料を測定し、実習過程での放射能物質の表面汚染状況を２次元にイメージングして、実習への応用を含めて検討したので報告致します。

１．はじめに

放射線管理区域内において放射性同位元素や放射線を取り扱う人を放射線業務従事者と呼び、放射線障害防止法等により、その人たちに対して教育と訓練を行うことを使用者（事業者）に義務づけています。筑波大学では筑波大学放射線予防規定により、放射線業務従事者、および初めて放射線業務に従事する教職員、学生を対象として、全学放射線管理委員会で企画した教育訓練の講習会をアイソトープセンターが実施しています。講習会は講義と実習からなり、講義では放射線についての知識や法的規制について学び、実習では放射線安全管理のための基礎としての個人被曝管理及び作業環境管理の技術を修得することを目的に、実習を通して各種の安全管理用放射線機器や放射線防護器材の使用方法を学習している。実習は選択制になっており、X線・加速器・密封線源を取り扱う者は実習Ⅰ「ガンマー線による被曝線量当量と被曝線量当量率の測定」を、非密封放射性同位元素を取り扱う者は実習Ⅲ「表面汚染の検査と除染」を履修する。今回の報告では、実習Ⅲ「表面汚染の検査と除染」における実習過程を、実習の進行状況を再現しながら輝尽性蛍光体を用いた積分型２次元放射線検出器：（バイオ・イメージングアナライザー BAS-1800 Ⅱ富士写真フィルム．平成１４年に導入）を使用して、実習で使用されている試料の表面汚染状況をラジオルミノグラフィ(RLG)法で測定することで、試料の表面汚染状況を２次元的にとらえ実習過程を分析し今後の実習に役立てることを目的にして行った。

２．バイオ・イメージングアナライザーについて

輝尽性蛍光体材料とレザービーム技術を組み合わせた積分型２次元放射線検出器である。輝尽性蛍光体材料であるイメージングプレート(IP)は通常のX線フィルムの千倍にもおよぶ高い感度、また５桁にもわたる広いダイナミックレ

ンジ、50 μm× 50 μmに達する位置分解能、大きな面積、及び放射線潜像の蓄積効果を有しており、Ｘ線回折、医療診断、電子顕微鏡写真Ｘ・γ線非破壊検査等多方面に利用されている。また、IP は可視光を当てることで既存の画像データを消去し、繰り返し使用できる。なお得られたイメージは電子ファイルとして保存もできる。

（１）．装置

①．画像読取部

BAS-1800II IP Reader

対応核種： ^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{33}Ｐ、^{35}Ｓ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、 中性子

読取サイズ：最大 23cm × 25cm（範囲指定方式）

画素サイズ：50 μ m/100 μ m/200 μ m 選択

階調数：65,536 階調 / 256 階調

ダイナミックレンジ：5 桁

感度：S ＝ 4000

画像サイズ：約 47MB/1 枚　（最大）

IP 消去器

イメージングプレート（IP）：BAS-MS2325（ サイズ：23cm × 25cm）

②．解析部

コンピューター：メインメモリー（380MB）、HDD（ 40GB）

15 インチ液晶モニター、CD-R/RW、解析ソフトウェア：Science　Lab

（２）．ラジオルミノグラフィ（RLG）法

RI を含んだ試料を一定時間露出させた IP をセンサーとし、読取り機であるバイオ・イメージングアナライザー（BAS1800 Ⅱ）において、レザー照射により IP 上の画素（ピクセル）から輝尽蛍光（photostimulated luminescence.PSL）を発生させ、これをスキャンして放射能強度をデジタル化する二次元の放射線計測法である。

３．実習Ⅲ「表面汚染の検査と除染」の概要

実習は２人１組で行われる。この実習では作業室の床の表面材であるロンリウムシート（30cm × 30cm）に水溶性の ^{32}P（約 3.7kBq）を付着させた模擬汚染試料を用意し、この試料の表面汚染状況をサーベイ法とスミヤ法で測定して評価し、次に除染の作業をした後、再びサーベイ法とスミヤ法で汚染の状況を評価する。この実習を通じて GM サーベイメータの使用法、ゴム手袋の着脱法、ポリエチレンろ紙の使用法、放射性廃棄物の分別処理法などを学習すると

ともに、実務として自分の実験室管理をする際の技法を学ぶ。

（1）実習内容と手順

①．サーベイ法による汚染個所の発見と測定

GM サーベイメータで ^{32}P を付着させた汚染試料の汚染個所を測定する。

②．スミヤ法による汚染個所の測定

スミヤろ紙にて汚染個所を拭き取り、そのろ紙を GM サーベイメータで測定する。

③．スミヤ拭き取り後の汚染個所の測定

スミヤろ紙で拭き取り後の汚染個所を GM サーベイメータで測定する。

④．汚染除去作業後の測定

水で湿らした紙ガーゼで汚染個所を拭き取り、除染作業後汚染個所を GM サーベイメータで測定する。 汚染が残っていたら、水の代わりに除洗剤（デコン 99）を使う。測定値が BG（バックグランド）の３倍以下もしくは、５回以上除染しても３倍以下にならない場合は除染作業を終わる。

⑤．廃棄前の測定

除染作業を終了した後のロンリウムシートを廃棄する前に、スミヤ法により汚染検査を実施しスミヤろ紙を測定する。

（2）実習の測定結果

測定値は同一場所において GM サーベイメータで５回の測定を行い、その平均値を測定値とした。

作業内容	測定方法	測定値　cpm					
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	平均値
作業前BG	サーベイ法	65	60	62	64	68	64
汚染検査	サーベイ法	25000	26000	25000	26000	26000	25600
	スミヤ法	18200	18200	18200	18300	18500	18280
スミヤ後	サーベイ法	5200	5400	5400	5300	5400	5340
除染後	サーベイ法	2900	3000	3000	3100	3100	3020
	サーベイ法	2500	2600	2550	2600	2500	2550
	サーベイ法	700	680	720	730	720	710
	サーベイ法	400	380	400	390	410	396
	サーベイ法	380	380	360	390	370	376
廃棄前	スミヤ法	120	130	130	120	125	125
作業後BG	サーベイ法	68	67	70	72	66	69

４．ラジオルミノグラフィ(RLG)法による試料の表面汚染状況の測定

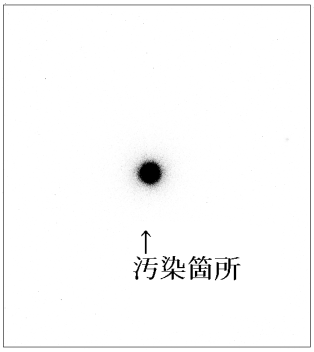
前記実習状況に即し､実習で使用した汚染試料を一定時間 IP に露出しその IP をバイオ・イメージングアナライザー で読みとった。

（１）測定試料及び露出時間

実習内容		測定試料	試料の状況	露出時間
汚染検査	①	ロンリウム汚染試料	32Pで汚染させた試料	10min
	②	スミヤろ紙	汚染個所を拭き取ったスミヤろ紙	10min
スミヤ後	③	ロンリウム汚染試料	スミヤろ紙で拭き取られた後	10min
除染後	④	ロンリウム汚染試料	水で湿らしたガーゼで除染作業（1回目）した後の試料	10min
		ロンリウム汚染試料	水で湿らしたガーゼで除染作業（2回目）した後の試料	10min
		ロンリウム汚染試料	除染剤で湿らしたガーゼで除染作業（1回目）した後の試料	10min
		ロンリウム汚染試料	除染剤で湿らしたガーゼで除染作業（2回目）した後の試料	10min
		ロンリウム汚染試料	除染剤で湿らしたガーゼで除染作業（3回目）した後の試料	15min
廃棄前	⑤	スミヤろ紙	除染作業終了後の試料の汚染個所を拭き取ったスミヤろ紙	15min、5h

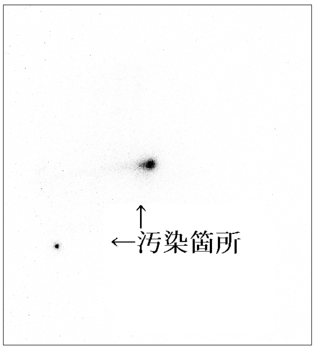
（２）測定結果

以下にバイオ・イメージングアナライザー で読みとった画像の結果を図１に示す。各画像は IP を測定（測定エリアは 22.5cm × 25cm）したイメージ画像であり、黒化された部分は放射線を検知した場所を示し、放射線の量は画像上の黒化量に比例する。実習③スミヤ後の汚染箇所の画像化ではスミヤ作業により遊離性の放射性物質が別の箇所に移ってしまったことを示していることがわかる。実習⑤スミヤろ紙による除染後の汚染箇所拭き取りの画像化では、得られた画像上の情報量が少なく放射能物質を判別できる黒化量が得られなかったので露出時間を５時間に増やし再度測定した結果を露出時間 15min の結果といしょに画像化した。図２は、汚染箇所における除染の過程について放射性物質が除染作業により拭き取られていく様子を得られた画像の黒化部分の輝尽蛍光量について分析し､それをグラフ化したものである。横軸は検出された領域の長さを示し単位は mm である。縦軸は PSL 値（Photo Stimulated Luminescence の略、１画素の生データの QL 値（Quantum Level ：機器が読み取った発光量を濃度階調で分割したもので画素形成、定量単位の基となる値）を１対１で変換した場合の１画素の値）を示し、IP に露光された放射線量に比例した輝尽蛍光量を示した任意単位（放射線の絶対量を表す単位ではない）である。

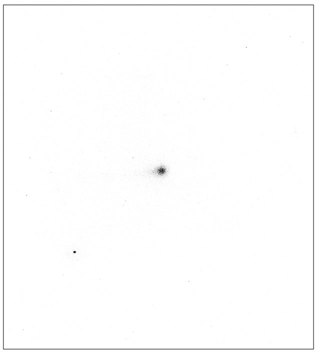


実習①汚染試料

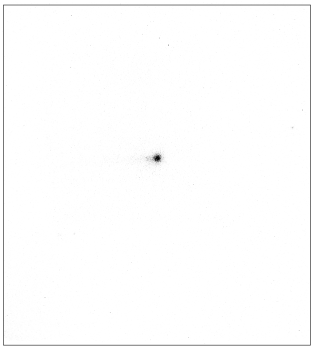
実習②スミヤろ紙
汚染箇所を拭き取る



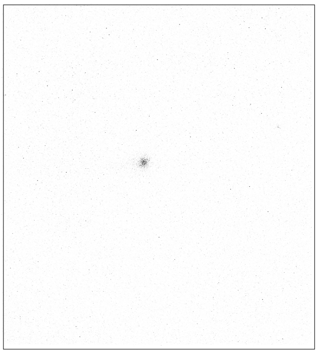
実習③スミヤ後の汚染箇所
遊離性の汚染が別に移る



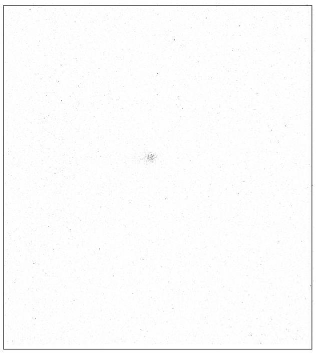
実習④除染１回目汚染箇所
水で湿らしたガーゼ



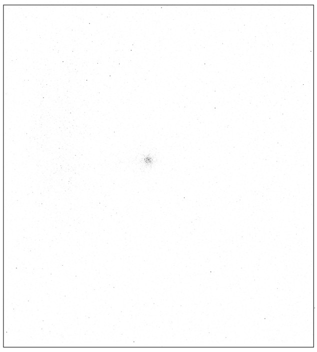
除染２回目汚染箇所
水で湿らしたガーゼ



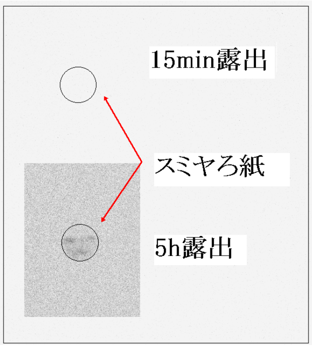
除染３回目汚染箇所
除染剤で湿らしたガーゼ



除染４回目汚染箇所
除染剤で湿らしたガーゼ

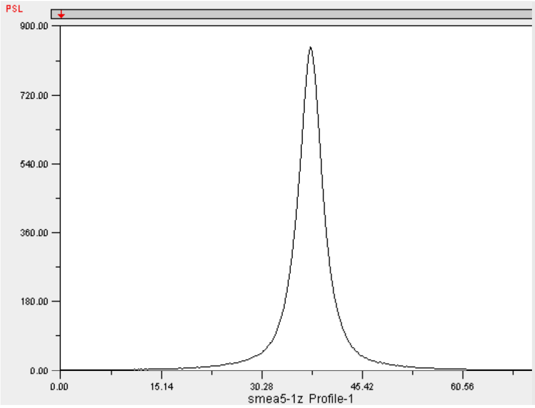


除染５回目汚染箇所
除染剤で湿らしたガーゼ

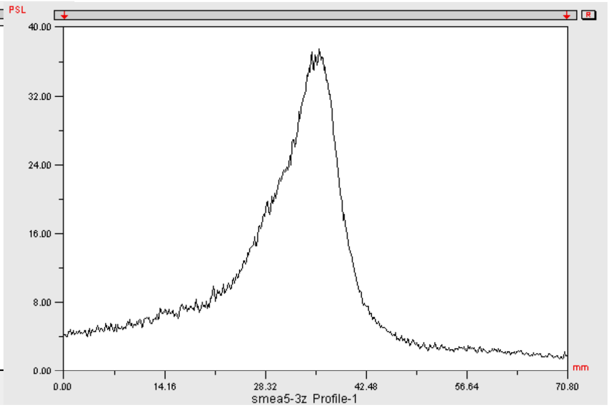


実習⑤スミヤろ紙
除染後汚染箇所を拭き取る

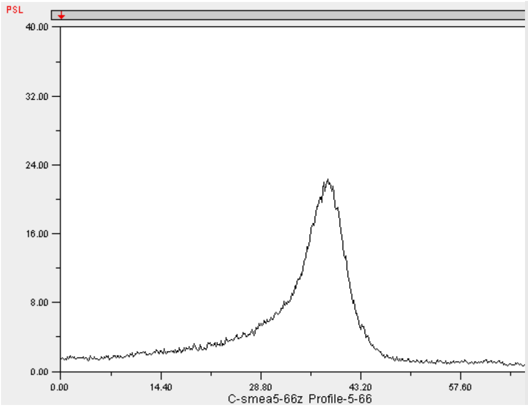
図１イメージングアナライザーで読みとった画像



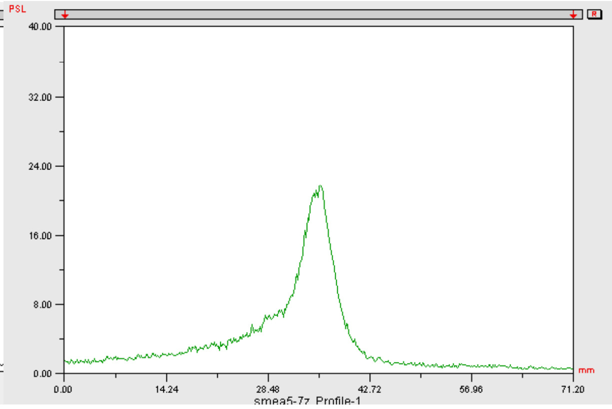
実習①ロンリウム汚染試料
（PSL 値レンジ：900）



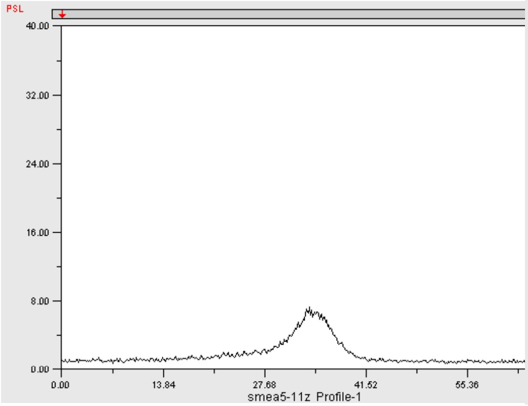
実習③スミヤ後汚染箇所（除染前）
（PSL 値レンジ：40）



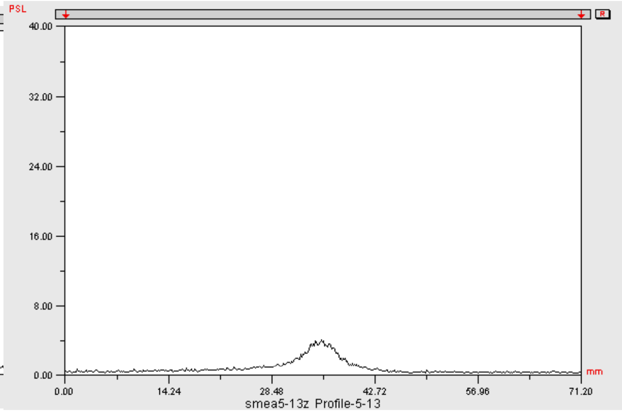
除染１回目汚染箇所
水で湿らしたガーゼで拭き取る



除染２回目汚染箇所
水で湿らしたガーゼで拭き取る



除染３回目汚染箇所
除染剤で湿らしたガーゼで拭き取る



除染５回目汚染箇所
除染剤で湿らしたガーゼで拭き取る

図２汚染箇所の除染時の輝尽蛍光量の変化

５．まとめ

実験の結果、図１、２より実習の過程を IP で取ることによって放射性同位元素による汚染の状況を画像としてとらえることができ、視覚として認識できるようになることがわかる。実習においては、使用している放射線の測定機（GM サーベイメータ）の窓面積（約 21c ｍ ^{2}(直径 5.2cm)）が大きく、汚染の拡がり、除染作業の進行状況を検出器の数値の読み取りだけから正確に把握することは初心者にとってなかなか難しいが、これを画像化することで容易に理解できることがわかる。また、実習③に見られるように汚染が拡がっていった場合にも状況を見ることが可能でありかつイメージ画像の輝尽蛍光量を分析することにより、汚染の拡がり領域及び放射線量についても正確に把握出来ることがわかる。実際の実習においてもスミヤ及び除染等の拭き取り作業では汚染を拡げてしまう場合もあり、その状況をイメージ画像化できることで汚染を広げない除染作業を視覚によって理解させることができる。以上のことからイメージングアナライザーを放射線業務従事初心者講習会の実習「表面汚染の検査と除染」で使用することは実習者が実習過程を理解する上で大変有効であると思われるが、１データの測定時間（IP の露出時間（今回は 10~15min)、イメージ画像の読取時間（4min)）に時間がかかること、使用した IP のデータを消去し再び使用可能な状況にするのに時間（15min）がかかること、および測定システムが高価（１セット 500 万円以上）であるため台数を準備出来ないなどの問題点は多々ある。しかし、今回得られた結果を実習に導入していくため、および放射線管理の実務としての放射性同位元素による汚染の状況の定期測定への応用などに有効であると思われるので、今後さらに検討していく。

謝辞

本報告書を作成するにあたり、御指導ならびに御助言をいただいたアイソトープセンター末木啓介助教授に深く感謝いたします。

引用文献

１）富士写真フィルム：バイオ・イメージングアナライザー操作ガイド
２）森　千鶴夫；Radioisotopes, 48,589-599（1999）
３）中島榮一　；Radioisotopes, 47,953-965（1998）
４）海老原　寛；筑波大学放射線業務従事者講習会実習テキスト　UTRIC-68

実験室の法規制

筑波大学人文・数理等教育研究支援室（物理学系）　平田　久子
筑波大学人文・数理等教育研究支援室（総務・研究協力担当）橋野　正美

経過

実験室には様々な機械が設置されている。それは民間製造企業のように規模が大きければ夫々を規制・管轄する法律の対象となり、安全が図られている。しかし大学研究室規模であると、その方面の経験を積んだ人が居ればよい、程度の扱いで、今迄はやって来られた。更に最上級規模の設備の許認可機関は国の省庁であるが、次のクラスの規模の多くのものは都道府県等の地方自治体に委ねられていて、国の機関である大学の方が上位に位置していることで、厳しい規制を免れてきたことは事実である。今般平成１６年度の国立大学の独立行政法人化で国立大学法人となることを踏まえ、実験室の身の回りの法規制のあるものを改めて洗いなおした。

概要

筑波大学学内共同利用施設プラズマ研究センターにおいては、センター勤務の教職員だけでなく関係学系より参加する教官技官と共同研究体制をとりつつ実験を行っている。主たる実験装置は『複合ミラー型プラズマ閉じ込め実験装置　ガンマ１０』である。そこには法律の規制をうける可能性のあるものが幾つかある。閉じ込め磁場を形成、及び、プラズマ加熱のための電力は東京電力より６．６ｋＶの高電圧受電をしている。プラズマ閉じ込め装置の真空排気には一般の真空ポンプに加えて、高圧（！）ガスを用いている。また絶縁油等の大量貯蔵をしている。生成し閉じ込め加熱されたプラズマはＸ線を放出する可能性をもっている。周辺設備ではホイストクレーンを設置している。日々の運転に際し、実験室内の連絡用にトランシーバを利用している。本報告はプラズマ研究センターにおけるこれらに係る法規制を整理したものである。但し、居住環境等の一般的事項についてはここでは触れない。これらは夫々の担当者の運営のもとで法律への対応を行っている。夫夫の担当者は個々の装置を最も利用する者、勉強してきた分野の近い者が分担し、尚且つ特定の者に負担が偏らないよう各人に分担を振り分けている。筆者も例外なく分担をしている。

各論

１　６．６ｋＶ受電及び８００ＭＪ立型電動発電機設備

電力使用量は　１ケ月最大１５００ＭＷｈ　である。

最大出力は　１８ｋＶ、２５０ＭＶＡ、４秒　である。

この件については筑波大学全体として電気事業法第６６条で定義される。この定義により、電力供給を行っている東京電力と筑波大学との契約により電力供給を受ける。大学施設部に電気主任技術者が置かれ、運用されている。センターはその一環に位置することになり、受電容量が大きいため、方面の知識ある職員を置いて部局内の保安に努めることを電気主任技術者より依頼され、それを遂行している。即ち、電力受電に関しては大学一括手続きによりセンターでは書類上の法規制はされていない。大学電気主任技術者責任のもと、保安に努力する、という範囲である。

２　立型電動発電機設備軸受用タービン油大量使用

危険物第４類第３石油類タービン油７９００リットル　を立型電動発電機軸受に使用。

消防法第１０条、及び同別表、危険物の規制に関する政令第３条第４号により、「一般取扱所」指定数量３．９５倍、とされる。

消防法第１３条及び危険物の規制に関する政令第３１条の２第６号により危険物保安監督者（有資格者）の選任を必要とし、基準にのっとった保安の遂行が求められる。

３　プラズマ閉じ込め実験装置

核融合実証を目指したプラズマ閉じ込め実験装置は、炉の立場で見ると、原子力基本法第３条（定義）第１号「原子力」に該当するので同法の範疇に入る。しかし乍ら、核原料物質、核燃料物質及び原子炉の規制に関する法律第２条（定義）第４項原子炉、原子力基本法第３条第４号原子炉、それの但し書きである同施行令第１条、第１条の２（核燃料物質）、第６条の２（研究開発段階にある原子炉）にも核融合装置は一言も触れられていない。従って現状では実験装置本体は原子力関連法の適用を受けない。しかし乍ら遠からぬ将来、研究の進展により条文に文言が加えられる可能性がある。

電気設備として電気事業法に照らしてみると、第２条（定義）でも負荷の立場にあるプラズマ閉じ込め実験装置の電気要素は適用を受けない。負荷容量が大きいため一般的な電気設備技術基準を自主的に遵守して保安に努める必要がある。

４　磁場

ガンマ１０で発生する強磁場については電気事業法には一切触れられていない。その他の環境関係法、保健衛生関係法にも見当たらない。僅かに労働安全衛生法第２０条（事業者が危険防止に必要な措置を行う業務）第３号電気、熱その他のエネルギーによる危険、の「その他」、第２２条（事業者が健康障害を防止する措置を必要とする業務）第２号放射線、高温、低温、超音波、騒音、振動、異常気圧等による健康障害、の「等」に辛うじて該当があるだろうか。現実に国際熱核融合炉ＩＴＥＲの当初からの設計に於いて、磁場

の人体への影響を考慮して定常磁場環境下の労働時間を制限するする方針をたてている。磁場コイル通電中の磁場環境に人が入ることは同時に放射線被曝の恐れもあり制限がある。また磁場コイルを中心とする装置付近は残留磁場があり、ＩＴＥＲ級の実験装置では非通電時でも磁場の人体への影響を考慮していく必要がある。

現在のところガンマ１０級の磁場強度、磁場のパルス運転という点では法律の規制は見当たらないが、将来はリニアモーターカーの実用化等、一般人の生活の近くに磁場の概念が入ることをを考慮して法制化があり得ると考える。

５　電子ビーム用絶縁油貯蔵

地下貯蔵タンクにて危険物第４類第３石油類絶縁油１００００リットル　を貯蔵。

消防法第１０条及び別表、危険物の規制に関する政令第２条第４号により「地下タンク貯蔵所」指定数量１０倍、とされる。

消防法第１３条、危険物の規制に関する政令第３１条の２により保安監督者は不要である。危険物取扱者（有資格者）のみ必要。

現在は同設備は休止中であるが、保安監督体制は継続している。即ち、前項一般取扱所同様に安全基準の維持に努めている。

６　液体窒素の大量貯蔵、使用

屋外のコールドエヴァポレータ内容積１００００リットル１基、４９００リットル１基を用い、液体窒素を貯蔵し、配管により建屋内のヘリウム液化装置の予冷、及び液体窒素パネルに導入し、冷却し、最終的にガンマ１０真空容器の真空度向上に用いている。運転時の１日当たりタンクローリーより供給を受ける量は３０００～５０００リットル２便である。

法的な基準に基いた　貯蔵能力は１０８３５．３kg、処理能力は５９．６Nm^3 ／日　である。

設置は昭和６３年で、当時の高圧ガス取締法第５条第１項第１号により「高圧ガス第１種製造者」として承認された。同法第２７条の２第１項により保安統括者を必要とし、センター長がその任についた。同法同条第４項により保安係員として有資格者を必要とした。

平成８年規制緩和と自主保安を目指した大幅な法改正があり、高圧ガス保安法となる。同法第５条第２項により「高圧ガス第２種製造者」に変更となった。同法第２７条の２第１項第２号、一般高圧ガス保安規則第６４条第３項により保安監督者が不要となる。同法同条第４項及び同規則第６６条第１項第１６号により保安係員（有資格者）を依然として必要とする。

７　ヘリウム液化装置の運用

ガンマ１０真空容器１８０立米の排気は軸流分子ポンプ１５００リットル／秒　３式と３０００リットル／秒　３式により10^{-5}パスカル迄排気しているが、更にプラズマ性能をより高く上げる可く液体ヘリウム用のパネルを真空容器内に設け、液体ヘリウムを送り

込んで、１０$^{-6}$パスカルの真空度を得ている。

このヘリウム液化装置の定格は　２５７．５０冷凍トン／日　である。

これも前節の液体窒素貯蔵同様に昭和６３年２月の設置である。従い高圧ガス取締法第５条第２号により「第１種高圧ガス製造者（冷凍）」とされた。同法第２７条の４第１項、及び冷凍保安規則第２２条第２号により冷凍保安責任者（有資格者）を選任した。同じく第２４条により代理者（有資格者）を選任した。

更に同様に平成８年高圧ガス保安法に改正され、第５条第１項第２号により第１種製造者、同法第２７条の４第１項第１号により冷凍保安責任者選任、同第３９条代理者の選任、夫々が有資格者を必要とすることも変更になっていない。

設置申請時、２４時間連続運転している故に、代理者２名増員することを指導された。現在有資格者は５名いる。

８　水素ガスの使用

プラズマ生成に使用する水素ガスは大気圧の１／２程度の稀薄さで、１２分間隔のパルス運転でその上１秒間に満たない時間しか実験装置に導入しない。年間使用量は３立米程度である。この水素ガスは前節同様に高圧ガス取締法時代に、ヘリウム液化装置設置申請時に一括で他のガスと一緒に、７立米ボンベ２本にて申請をし、貯蔵として承認されている。これも新法になり貯蔵の規制が緩和されたが、依然同じ量の貯蔵に留めている。従って、高圧ガス保安法第２４条の２第１項、高圧ガス保安法施行令第７条第２項により適用を受けない。勿論自主保安に努めている。

９　放射線発生

原子力基本法第３条第５号に放射線が定義されている。プラズマ閉じ込め実験装置は放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律第２条第４項に定義される放射線発生装置の範疇に入る可能性がある。具体的な指定は放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律施行令第２条第８号にかかり得る。現在のガンマ１０の状況では適用外であるが、将来的にはプラズマ性能向上ばかりでなく原子力自体の規制がどの様になっていくかで微妙になっていくと思える。この件については検討を続けていくつもりである。研究所では安全意識の徹底をできるが、学生を受け入れている大学では毎年の新人の加入、学生実験の延長程度の意識のもとでの学生の安全の確保を考慮すると、放射線を大量に発生する可能性のある実験の遂行は難しい。

１０　高周波設備

ＭＨｚ帯、ＧＨｚ帯の大電力高周波を用いるプラズマ加熱装置にあっては電波法の適用の可能性を考慮していかなければならない。しかし乍ら少なくとも一般人の立ち入る場所においての電界強度が基準値以下であることは確認している。その他は現在のところは検討中である。

１１　トランシーバの利用

定格は　４６５MHz １W ２台、４W ２台　である。

電波法第１５条、無線局免許手続規則第１５条第６号（１）、同規則別表第１号の２により学長名で無線局免許申請を行った。これ以外には特別な資格者をこの容量では必要としない。但し５年毎の無線局の更新を必要とする。世話はアマチュア無線資格所有者が行っている。

１２　クレーン

床上操作クレーンが２基ある。

定格は　１５トン／３トン　１基、１０トン／３トン　１基　である。

設置については労働安全衛生法を準拠する人事院規則第７条により、大学事務局が管理を行っている。センターでは担当者を配置し、日常に自主点検を行っている。今後法人化により人事院規則による規制から、労働安全衛生法適用を受けることになるのでこの対応をしなければならない。

使用、即ち運転操作に関しては、労働安全衛生法第６１条第１項により床上操作式クレーン技能講習修了を要する。センター教職員は全員、玉掛技能講習も含め修了しているが、学生については、年次進行で入れ替わりがあるので数年毎にクレーン協会に依頼し、講習を行って貰い、極力受講するよう指導している。

これとは別に発電機棟には主巻５０トン、補巻５トンの天井走行クレーンがあるが、使用は発電機分解点検及び組み立て時に限っている。その際には使用にあたる点検請負業者に対し、クレーン運転免許所持者の派遣を作業仕様に盛り込んでいる。これの点検については床上操作式クレーンの定期点検時に一緒に行っている。

１３　圧縮機

労働安全衛生法第２０条第１項をうけ、同法施行令第１条第７号に該当する圧縮機が１台ある。

同法第４２条及び同法施行令第１３条第８号にて第二種圧力容器として、安全を図ることを励行している。また、同法第４５条第１項、同法施行令第１５条第１号にて定期に自主点検を行うとされており、実行している。

これとは別に遥か大規模な圧縮機があるが、各論７で述べている高圧ガス保安法にて承認を受けており、本項には適用されない

１４　研削砥石

労働安全衛生法第４２条同法施行令第１３条第９号に該当するグラインダがある。同法第４３条同規則２５条第１号にて安全装置を具備することになっており、取り付けられている。

さらに法第５９条第３項、同規則第３６条第１号にて砥石の取換え業務にあって特別教育を必要としている。これには特別教育修了者を配置している。

１５　洗浄用薬剤

アセトンとエタノールを洗浄に用い、年間に夫々４０リットル程度消費している。ガンマ１０真空容器内に取り付ける部品を超音波洗浄する際にも使用しているが、使用時間中の単位時間あたりの薬剤蒸発量が基準値以下になる条件で使用している。プラズマ研究センターでは取り扱う可能性のある職員学生数は凡そ３０名いるので、表示、注意書きを施している。併せて教職員学生全員対象の年度初めの安全教育の際には徹底した注意を促している。

１６　電気操作作業

労働安全衛生法第５９条第３項、同規則第３６条第４号前段の高圧若しくは特別高圧充電電路の点検、操作に該当する業務がある。これについては然るべき講習を行い対応している。後段の低圧充電電路については数多の回路があるが、電気設備技術基準にのっとった設備であり、安全対策を施してあるので条項に該当する作業は無い。ではあるが、受電量が多いので、安全に留意するため細かなチェックシートを作り、確認した上での操作を行っている。また運転中の点検も細かく行っている。

１７　法律同士の抵触

前半で述べた個々の法律同士の抵触は、該当する法律の適用除外項目で指定されているので問題は無い。労働安全衛生法と他の法律とは適用除外項目は少ないが、この法律は労働者の安全に資する目的から、他の法律のハードウエアの安全を目的とするものとは本質的に立場が異なるので抵触は無い。

おわりに

本報告は平田が平成１５年度国立学校等技術専門官研修の際の業務にかかる報告発表として作成したものに加筆修正したものである。現場の立場で平田が考察し、総務の立場で橋野が法規に照らしチェックした。各論１～１２につては既に各省庁からの規制が行われているものを法規に照らして解釈したものである。１３以降については新たに法人化により人事院規則から労働安全衛生法へ移行することにより適用されるものを拾い上げたものである。

筑波大学で法人化を踏まえ、労働安全衛生法に照らしての安全点検が過日行われた。おかげで自身の担当以外の法規制全体を見て整理する機会を得たことになった。また、書き進むうちに考慮の外にあった適用外のものも思い浮かび、考察の結果改めて、適用外に至るという認識をもった。将来、設備、機器の仕様が増大、拡大した時に、考慮しなければならない可能性が生ずるという意味でも今回の検討は有意義であった。中でも労働安全衛生法は他の技術系の法律に比べ条文が複雑で非常に読み取り難い。従ってこれからも理解

することを鋭意努力する必要を感ずる。願わくば事業所たる大学に労働安全衛生法各論のエキスパートの存在を望む。

謝辞

理念と大綱を指導して下さった筑波大学名誉教授であり初代プラズマ研究センター長の三好昭一先生に深謝します。また、個々のハードウエアの定格について教えて下さったプラズマ研究センターの長照二センター長を始めとする各担当教官に感謝します。更に、労働関係法の勉強会を催し、理解を深める機会を作って下さった人文・数理等教育研究支援室立山雅博室長に感謝します。更に加えて、勝手の難しい労働安全衛生法各論について実際の運用を行っている東芝電機サービス株式会社菊地伸夫課長に諸々をお教え頂いたことをここに記し、感謝します。

参考文献

三好昭一編　ミラー型核融合装置　アイピーシー
平田　筑波大学技術報告　Ｎｏ．１９（１９９９）　１
電気事業法
消防法及び関連省令規則
原子力基本法、核原料物質、核燃料物質及び原子炉の規制に関する法律、関連省令規則
高圧ガス保安法及び関連省令規則
放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律及び関連省令規則
電波法及び関連省令規則
労働安全衛生法及び人事院規則
環境関係法令、保健衛生関係法令
プラズマ・核融合学会誌　第７３巻別冊

ブナ伐採跡地に植樹したブナ苗木の成長

筑波大学研究協力部研究協力課
（菅平高原実験センター）
清水　悟

緒言

ブナは本邦の冷温帯林を代表する落葉広葉樹で、いわゆる極相林の主要構成樹種である。現在でも北海道南西部、本州、四国、九州の山地などにブナ林が見られるが、大規模な林は白神山地などに残っているのみである。しかし、明治、大正までは本州中部と東北の山地を広く覆っていた。

本センターは長野県真田町の菅平高原にあるが、この地もかつて標高 1100mから1800m付近まではブナを主体とした森林（極相林）に覆われていたと推定される。しかし、現在菅平高原と呼ばれる地域にブナ林は存在せず、周辺に小面積の林が残されているのみである。そこで、本センターではブナ林の復元を試みることにし、昭和35 年頃から先駆樹種の植え込みを開始し、その生長を待ってその下に昭和 52 年からブナ苗を植え込み、継続観察しているが順調に生育している。

ところで、天然のブナ林においては理論上ブナ林の林床にブナの実生が生じ、生育してやがて老木と交代してゆく天然更新が起こるとされる。しかし、北信地区（長野県北部）に見られるブナ林では、ブナ林縁や林内の林道脇に 1、2 年生の幼木を多数みかけるが、林内に幼木、や低木をほとんど確認できない。このため、ブナ天然林の伐採跡地にブナ苗を植え、再生することが試みられるようになったが、その成否ははっきりしない。

そこで、ブナ林再生の基礎的なデータを得ることを目的に、ブナ林伐採跡地にブナ苗を植樹し、その活着や生長の様子を観察記録した。そして、その結果を菅平高原実験センター樹木園内のブナ林復元に役立てることにした。

試験地の概要と試験方法

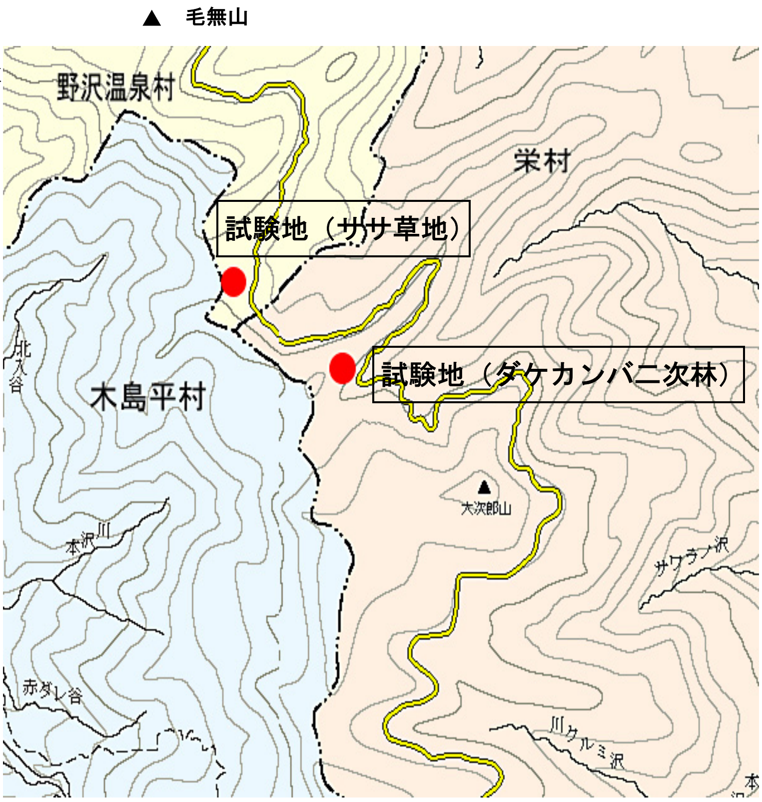


図 1　試験地周辺地図

試験地は長野県飯山営林署の協力を得て、長野県下屈指の豪雪地帯である長野県下高井郡野沢温泉村の毛無山、および下水内郡栄村の大次郎山の間の、標高約1,700mの地に２ヶ所設けた（図1）。両試験地ともかなりの斜面であった。

植樹苗木は、本センターの苗圃で育苗した樹高約210cm、胸高直径平均1.3cm、8 年生の苗木を用いた。

植樹場所としてブナの伐採跡地に成立し、林床がササに覆われているダケカンバ二次林内と、高さ平均 2mのチマキザサ、チシマザサ（ネマガリダケ）草地内の二ヶ所を選んだ。両植樹予定地で 100m×150mの区画を設定し、帯状にササを刈り込み、各場所に10m間隔で総計150本ずつ植樹した。その後の測定、観察を容易にする目的で、各苗木には番号札を付した。

1989年6月に植樹後、1991年7月、1994年6月に試験地を訪れ、苗木の生存率、活着個体の樹高、胸高直径の測定、実験地の環境の観察を行った。ここでは苗木の生存率、損傷率について報告する。

結果

写真 1　幹の中折れ

写真 2　一部分の幹折れ

植樹後２年後（1991 年）の観察の結果、雪害による幹折れ、あるいは根元から折れた（写真 1、2、3）苗木の数はダケカンバ二次林内で 54 本（36％　表1）、サ

サ草地内では 63 本(42%　表2)に達した。他にウサギによる食害を受けた苗木が全体で 0.7%あった。しかし、このように雪害、あるいは食害にあった苗木は枯死しておらず、いずれも萌芽していた。即ち損傷率は高かったが生存率は 100%であった。

5 年を経過した 1994 年の結果ではさらに幹折れが進み、ダケカンバ二次林内では 82 本(55%　表1)、ササ草地内では 132 本(88%　表2)であった。また 5 年後になると枯死したものがあり、生存率はダケカンバ二次林内で 76%, ササ草地内で 57%であった。

写真 3　根元からの幹折れ

1989 年	1991 年	1994 年
150/150	54/150 (36%)	82/150 (55%)

表 1　ダケカンバ二次林内 幹折れ数

1989 年	1991 年	1994 年
150/150	63/150 (42%)	132/150 (88%)

表 2　ササ草地内 幹折れ数

考察

植樹ブナ苗木の幹折れの主な原因は雪であると思われる。この地域の積雪は 4m以上に達するが、春先には全体として斜面を滑り落ちるため、雪中に封じこめられている苗木の幹は谷方向に強く引かれることになる。その結果耐え切らなくなった幹が折れたものと思われる。損傷苗木の割合はサ草地で 5 年後に 88%、ダケカンバ林内で 55%と差が見られた。これは恐らくダケカンバ林内では幹が雪の下方への滑りを和らげる役目を果たすためであると思われる。これとは対照的にササは苗木と同様雪中に封じこめられるので、滑りを和らげる働きは弱いものと思われる。

生存率に関してはササの生長の速さが重要であると思われる。植付け時にはササを刈り払い、苗木は日射をさえぎるものが無い状態であった。ところが 5 年後の 1994 年にはササが 2m以上にまで成長した結果、ほとんどのブナの苗木はササに完全に覆われてしまっていた。植樹ブナ苗木は平均 2.1mの樹高があったにも係わらず、成長が極めて遅いため成長が速く 4～5 年で、刈り取り以前の背丈 2m以上に達してしまうササに追いつかれ、覆われてしまったことになる。このため、幹折れなどで樹高の低くなった苗木は十分な日照を得ることができず枯死したものと思われる。このことはまたササ草地内の生存率がダケカンバ林のそれより高かったことに反映されていると思われる。

北信地域に残されているブナ林天然林の多くは豪雪地域の斜面に成立している。その林床には積雪に強いチマキザサ、チシマザサ（いわゆるネマガリザサ）が密生しているのが普通である。この環境条件下で林床に生じた実生が生育途中に雪害を受けることなく、ササの丈を越すまで成長出来るのは極めてまれで、大半は幹折れ、日照不足によって枯死してしまうものと思われる。この試験結果はブナ林伐採後、あるいは間伐したブナ林内においてブナの植樹を行い、ブナ林を復元するには、雪折れ防止策と、植樹後しばらくの間ササの下草刈りを継続して行なうことが必要であることを示している。これらの作業は人力に頼る面が多く簡単ではないが、植樹した苗木の活着率はほぼ 100％であったことから、植樹によるブナ林の復元には期待が持てる。

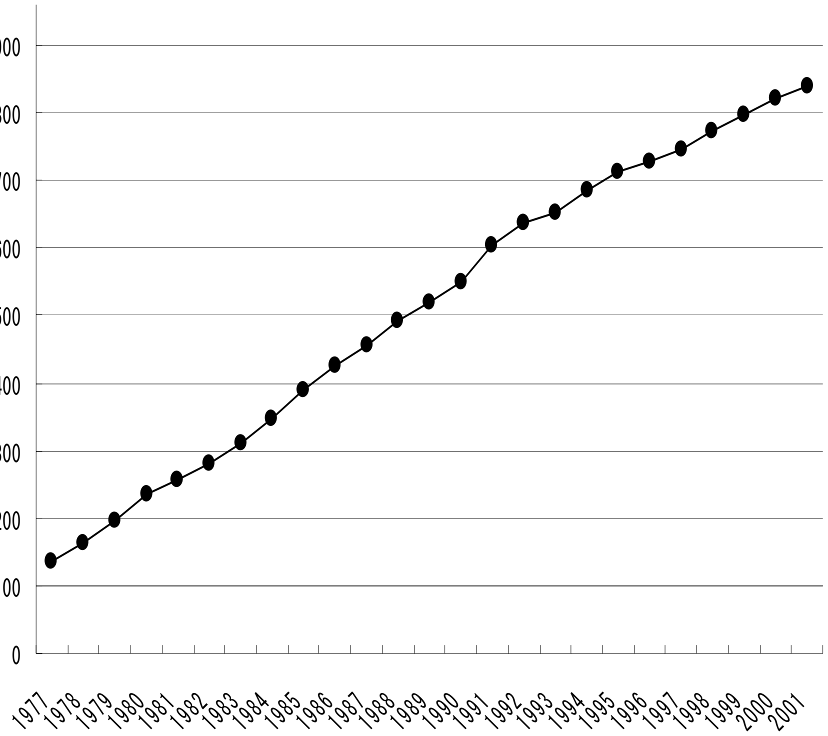


図 2　菅平高原実験センター樹木園内の 1977 年から 2001 年までのブナの樹高生長（200 本の平均）

最後に本センターにおける植樹したブナの生長を図2に示す。センター内樹木園の先駆樹種の下に植えられた苗木は、初期に下草刈り、雪折れ防止策を施された結果、試験地に比べ積雪が少ない(約 1m)、ササが林床にないなど条件は異なるが、ほぼ直線的に生育してきている。植樹直後の手入れの重要さを示す好例であろう。

なお当センター内樹木園でのブナの成長については、すでに筑波大学技術報告 No.22 P65-68（2002 年 3 月）に報告したので参照願いたい。

パーソナルコンピュータによるCAMACデータ収集系

杉山昭彦
筑波大学人文・数理等教育研究支援室（プラズマ研究センター）
〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

筑波大学プラズマ研究センター核融合実験装置ガンマ１０に付随するCAMAC*データ収集用コンピュータ及び周辺機器の新規導入と収集用ソフトウェア更新について報告及び考察を行う。

１．はじめに

当センターにて長くデータ収集用コンピュータとして使われてきたミニコンピュータ TOSBAC 7/70E が廃止機種となり、すでにメーカー保守可能期限も過ぎ、周辺機器を含めた修理・改良が困難となった。また、実験データ量の増加に伴い、その処理速度の面において、ショット間のデータ収集及びグラフック表示に過大な時間を費しており、データの迅速な解析にも支障を来たしている。以上の理由により、データ収集系コンピュータのハードウェア更新及び収集用ソフトウェアの更新が必要となった。以下、データ収集・転送、波形表示・印刷出力の各部における考察及び実施事項を述べる。

２．データ収集・転送

従来、筑波大学プラズマ研究センター核融合実験装置ガンマ１０用 CAMAC データ収集系では、すべての CAMAC クレートを光ケーブルにて連結するシリアルハイウェイ転送によるデータ転送方式を採用していた。今回、データ収集用コンピュータの更新、並びに現行のデータ転送方式より転送速度の向上を図る目的で、新たに Ethernet*によるデータ転送方式を採用した。

Ethernet は現在一般的に利用されているデータ通信方式の一つであり、これによって今後の保守及び収集システムの拡張を容易に実施できるという大きな利点が得られる。Ethernet 転送の採用は、これまで当センターに多数導入されている CAMAC データ収集システムハードウェア装置や、これらのハードウェア用収集プログラムの基本動作に大幅な変更を加えることなく、現行の装置を活かした上で効率的にシステム全体の転送速度の向上が図れる。また、今回の新収集プログラムによって作成されるショットデータのフォーマットは、現行のショットデータとファイル構成が同形式となる様工夫し、ユーザーがデータを利用する際に、新収集プログラム導入後もこれまでとの違いを意識することなく読み出し可能となっている。

2.1 ハードウェア

現シリアルハイウェイ転送方式はデータ処理室と実験室、夫々に配置されている各クレート間を絶縁するために光ケーブルを採用している。これを Ethernet 転送方式に移行するには、シリアルハイウェイ用クレートコントローラ及び電気信号を光に変換する U ポートアダプタに代え、パーソナルコンピュータ用クレートコントローラを導入し、これを接続したパーソナルコンピュータをネットワークに接続する。図１（右）にシリアルハイウェイ用クレートコントローラ＋U ポートアダプタにて制御されている従来方式の CAMAC クレートを、図１（左）には Ethernet 用クレートコントローラにて制御されている新規転送方式の CAMAC クレートを示す。

図１　新規転送方式（左）と現行転送方式（右）

従来方式では、図３の一点鎖線右側に示すようにすべてのクレートが光ケーブルによってミニコンピュータ TOSBAC 7/70E へ連結され、TOSBAC 7/70E から全クレートへ送られる制御命令及び全クレートから TOSBAC 7/70E へ受け渡される収集波形データの双方が、この光ケーブルを介して転送される。一方、新規転送方式の場合では、パーソナルコンピュータ用クレートコントローラをデータ収集プログラムをインストールした収集用パーソナルコンピュータ（収集 PC）に、PCI スロットに増設した増設カードを介して RS-485 インターフェース 40pin フラットケーブルで接続し、これを一対として各 CAMAC クレート毎に設置している。図３の一点鎖線左側にこれを示す。対となる収集 PC からクレートに対して一連の収集実行命令を発行し、クレート側から転送されて来るデータも一旦収集 PC 内ハードディスクへ格納するという、各クレートごとにそれぞれ独立した命令・収集形態を形成している。尚、クレートに接続する収集 PC は、距離が近い範囲にあるクレートであれば複数台の制御も可能である。

2.2 データ収集

各箇所に設置された収集 PC に一時格納されたデ

ータはデータ処理室に設置されている管理用パーソナルコンピュータ（管理 PC）に Ethernet を通じて ftp*転送される。管理 PC はすべての収集 PC に格納されているデータを回収し、それを 1 ショット分のデータとしてとりまとめ、データサーバとなっているワークステーション内 HDD の決められたディレクトリへと転送する。

また、管理 PC では収集条件の変更や CAMAC モジュールの追加などを施した場合のプログラム実行ファイル編集を行い、各収集 PC へ ftp 転送により新しい実行ファイルを送り込む。さらに、各収集 PC の状態表示やトリガ信号表示、データ収集状況表示などの各種状態表示（図２）を行うなど、全体の中枢的な制御を担っている。

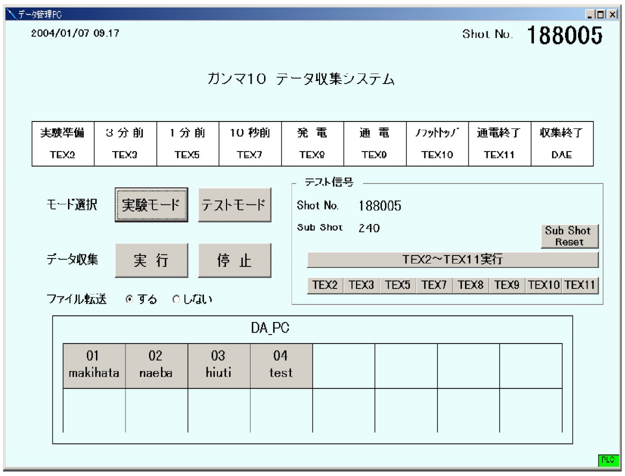


図２　管理ＰＣ各種状態表示

2.3 補足

現在 3 台の CAMAC クレートが新データ収集系に移行されて総合実験時に稼働している。旧収集系には、実験室（Experiment Room）に 4 台、遮蔽室（Shielded Room）に 2 台の CAMAC クレートが接続されており、逐次新収集系への移行を行う予定である。

さらに今回新規構築したデータ収集系ネットワークをローカルルータ*によってプラズマ研究センター内ネットワーク（gamma-net）から分離した。これは、他ネットワークゾーンからの不要な直接アクセスを遮断し不法侵入やコンピュータウイルスからの保護を図るとともに、ローカルネットワーク内の通信量の増大等による伝送効率の低下に影響されることなく、常時安定したデータ転送速度を維持することを目的としている。CAMAC データ収集系の全体構成を図３に示す。

３．波形表示及び印刷出力

データ処理系においてはその収集に要する時間とともに、ディスプレイへの波形表示及び印刷出力に要する時間もネックとなっていた。データ収集系の更新において、波形表示や印刷出力などの処理速度の向上は約１２分毎にショットを重ねる当センターの総合実験において、限られたショット間隔内に迅速なデータの解析を施す上でも重要懸案と言える。これまでは波形表示・印刷出力には TOSBAC 7/70E のグラフィック機能・ハードコピー機能を利用していたが、今回の更新の一環として、表示用パーソナルコンピュータを導入して、データサーバワークステーションのハードディスクからデータを読込み、java*を用いた波形表示・プリントアウトプログラムを使用して波形表示及び印刷出力時間の向上を図った。

４．結果

今までのデータ収集系が、TOSBAC 7/70E 専用オペレーションシステム上で動作する収集プログラムを採用していた為、他のコンピュータとの互換性が無く、TOSBAC 7/70E が動作不能となった時点で、収集システムを立ち上げる方法が皆無となってしまうことが最も懸念されていた。今回の新データ収集系には、オペレーションシステムとして Windows2000 を採用したことによって容易にシステムの追加・変更が可能となっている。将来、データ収集量の増加に伴い、中枢的な制御を担っている管理 PC の処理能力が飽和をきたしても、更に性能の高い windowsPC 機との入換が可能となっている。

また前に述べたように、旧 CAMAC 収集システムのシリアルハイウェイ接続においてはすべての CAMAC クレートが光ケーブルによって直列接続されており、この接続方式ではその内わずか 1 台でも動作不良が発生すると、それによってシステム全体が動作不能となってしまっていた。これに対して新 CAMAC 収集システムでは、Ethernet により各々の CAMAC クレートが並列接続されており、万一いずれかの CAMAC クレートが動作不能となってもシステム全体へ影響を及ぼすということがなく、安定したデータ収集を行える。

また、総合実験進行中での実行ファイル編集について、TOSBAC 7/70E システムにおいては、ショット間のデータ収集・各種出力のすべての過程が終了した後の、短い時間内にて変更編集せねばならず、効率的なファイル編集が困難だった。新収集システムでは、データ収集・各種出力過程にほぼ影響されることなくファイル編集が可能となっている。また、編集形式についても、管理 PC 内の表計算ソフトウェアにて実行ファイルを編集し、編集後のファイルを csv ファイル*として保存、収集 PC に転送するという形になっている。これにより実行ファイルの編集作業が効率的に行えるようになり、システム管理者のファイルアクセスの利便性が向上した。

５．まとめ

これまで述べたように、継続稼働が困難となってしまったハードウェアの更新、より高速なデータ転送方式への移行、データ表示時間及び印刷出力時間の短縮、という当初の目的が達成できた。またこれによってデータ収集システム全体の動作安定性が向上し、従来と比較して容易にシステムの拡張や改良を実施できるようになった。以上の点から今回採用した新データ収集系は、ほぼ目的を満足するものと言える。

なお、管理 PC 及び収集 PC に組込む収集制御ソフトウェアは（株）東芝が担当、java による波形表示プログラムは当センター立松芳典講師が作成した。

用語解説

・CAMAC

Computer Aided Measurement And Control の略。コンピュータを用いて大量のディジタル情報を取扱う際の国際規格。

・Ethernet

Xerox 社と DEC 社が考案し、IEEE802.3 委員会により標準化された LAN 規格。元々10Mbps タイプの LAN 規格の名称だったが、現在は Fast Ethernet/Gigabit Ethernet を含んだ総称としての意味合いが強い。

・ftp

File Transfer Plotocol　TCP/IP 使用のネットワークでファイルを転送する際に用いられるプロトコル。

・ローカルルータ

２つ以上の異なる LAN 間の経路制御を行う機器。公衆回線や専用線といった LAN 以外の通信回線を介さないネットワークの接続に用いる。

・java

Sun Microsystems 社が開発したプログラミング言語。既存の言語の欠点を踏まえて一から設計された言語であり、今までの言語にない完全なオブジェクト指向性を備えている。強力なセキュリティ機構や豊富なネットワーク関連の機能が標準で搭載されており、ネットワーク環境で利用されることを強く意識した仕様になっている。基本的には特定の OS やマイクロプロセッサに依存することなく動作する。

・csv ファイル

Comma Separated Values　データをカンマ","で区切って並べたファイル形式。汎用性が高く、異種アプリケーションソフト間のデータ交換に使われることも多い。

参照 URL

本報告内に記載されている用語解説に、以下の URL を参考といたしました。

http://e-words.jp/

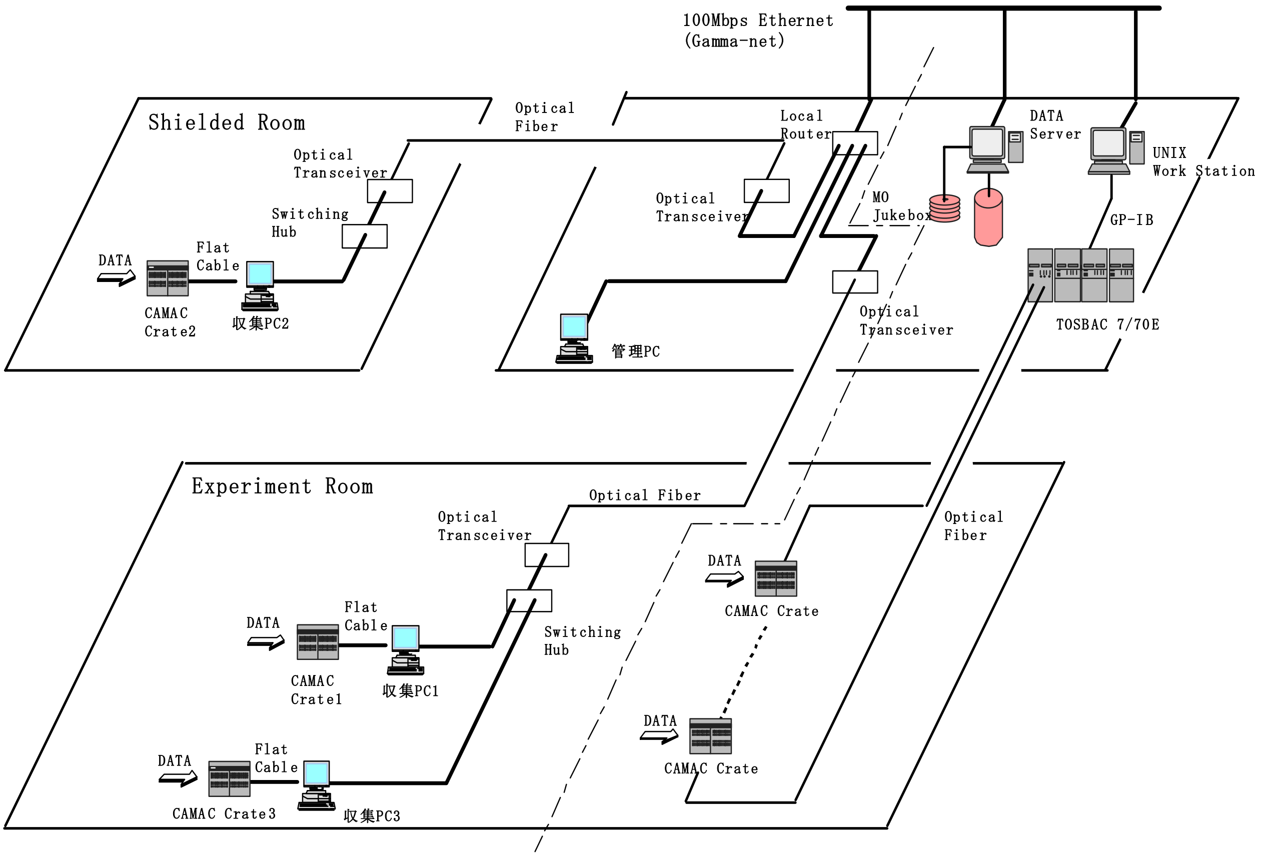


図３　CAMACデータ収集系全体図

溶接応力を利用した反りの修正

石川健司
筑波大学人文・数理等教育研究支援室・工作センター
〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

ステンレス製の真空装置用フランジに，補強のため，等辺山形鋼をイナートガスアーク溶接（TIG）すると反りを生じた．フランジに応力を発生させる事により，反りは改善できた.

1． はじめに

溶接は金属を溶融状態にして融着させる，材料が局部的に加熱・溶融・冷却されるので，高温では塑性変形，冷却に際しての収縮が起こり，残留応力や溶接変形を起こす.

本報告は，技術報告 No.22 の「真空チェンバーの製作」[1]で使ったフランジが，反りを生じていたので，反りの反対面に溶接応力を発生させ，反りを改善した事を報告する.

2． 作業内容

金属を加熱すると膨張し，そのまま冷却すると収縮するが，応力は発生しない．溶接は局部的に材料を溶融させ構造的に一体化する．溶接部は局部的に急激に高温に達し，体積の大きい低温部への熱伝導によって急速に冷却される．この間，材料の機械的性質は温度によって大きく変化する．このような現象がいずれも局所的であるために，材料の温度上昇時の膨張あるいは冷却時の収縮が他の部分によって拘束されるので，溶接応力が生じることになる[2].

2.1 フランジの反り

真空装置用フランジ（SUS304）は VF550 に相当する。板厚は軽量化のため，JIS（日本工業規格）の基準値より 9 ㎜薄い 15 ㎜にしてあり，補強のために中心から 100 ㎜離れた位置に長さ 600 ㎜のステンレス製等辺山形鋼（40×40×ｔ5）を断続溶接してある．図 1 にフランジを示す.

このフランジを使って，チェンバーを真空にする際は，大気圧の状態の時にチェンバー側からボルトでフランジを締めつけておかないと，真空度がターボ分子ポンプを作動できる領域に，到達できなかった．適当な真空度になった状態では，このボルトを緩めても大リークが起こるなどの問題はなかった.

フランジの真空側に直定規を当て，どれくらい反りがあるか検査してみる．0°-180°方向では，反りはないと言える．90°-270°方向では，両端と中心ですき間があり，アングルを断続溶接した場所で反りを生じている事が確認できた.

フランジがどの程度反っているのか大気圧中で，チェンバーにフランジを載せ，チェンバーとフランジの間に O リングを入れ，フランジを固定しない状態で，各位置のすき間をすき間ゲージで測定する．この時，チェンバー側の O リング溝の深さは 7 ㎜，O リングの太さは 10 ㎜なので，すき間が 3 ㎜以下でなければならない．表 1 は，測定値である.

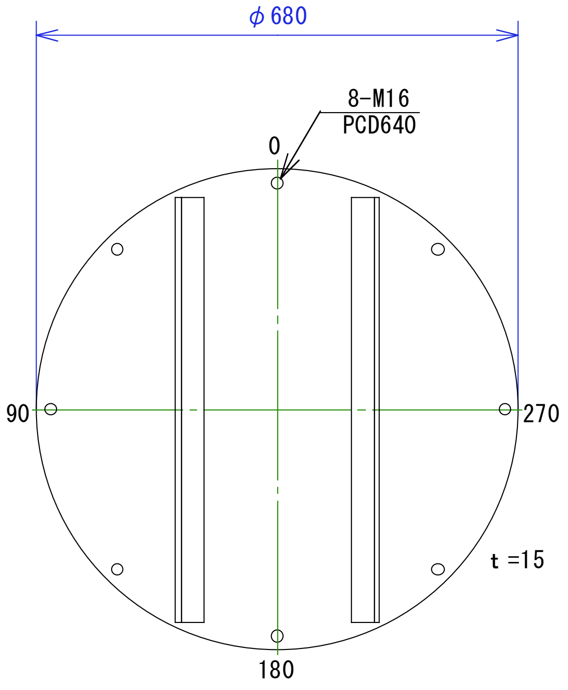


図 1：フランジ

表1. すき間の測定値

角度 (deg)	すき間 (mm)
0	1.90
45	2.60
90	3.17
135	2.50
180	1.85
225	2.55
270	3.60
315	2.95

この時の位置は，図 1 の頂点を 0 とし左周りに 45°間隔で測った.

この表をグラフにしたのが，図 2 である。

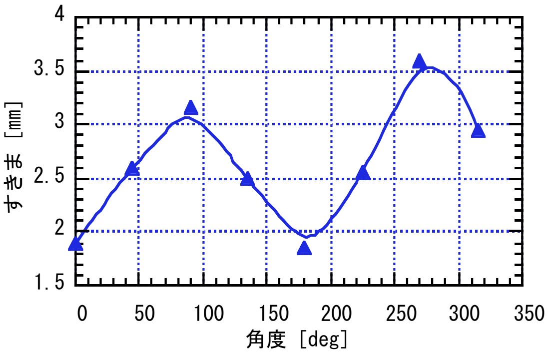


図 2：位置とすき間

2.3 反りの修正

今回溶接したフランジは，径に対し板厚が薄いので溶接応力が，残留応力とはならずに，溶接変形したと考えられる．

溶接変形の要因の一つとして，溶接熱がある．溶接電流，溶接速度，アーク角度などが溶接部分に不均一な温度分布を生じ，アーク加熱部分の体積変化と溶着金属の収縮によって，反りなどの溶接変形を起こすか，残留応力となる．
厚板では，母材の変形が許されないので残留応力となるが，薄板は変形しやすく残留応力は少なく，溶接変形となる[3].

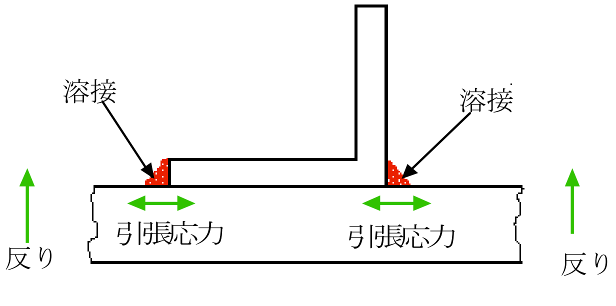


図 3：溶接断面

図 3 において，アーク溶接を行なった．アーク加熱時は電流を大きくし加熱時間を短くしたが，冷却時の収縮で溶接部分に引張応力が発生し，結果として溶接部分の両側が持ち上がるような形で，反りを生じた．

修正の方法としては，引張応力が発生しているところを，均一に加熱し応力を除去するか，または，切削加工によって平面を出すと考えられるが，フランジが大きすぎて均一に加熱する設備が無い．

以上の事から，等辺山形鋼を溶接して発生した引張応力と，つり合うような応力を，反対面に発生させれば，反りは消滅するはずである．溶接機を使い，局部的に加熱し冷却すると，溶接の経験から，応力が発生することを知っていたので，この方法を使ってみた．

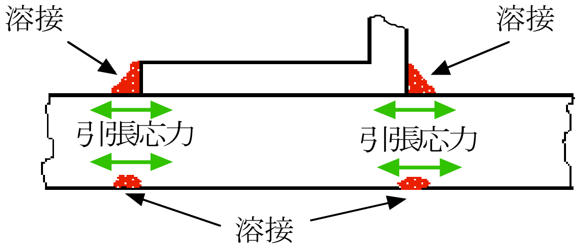


図 4：応力の説明

図 4 は，フランジに等辺山形鋼を溶接した断面で溶接した時の引張応力を示している．また修正するためのアーク柱を照射した位置を示し，両方がつり合っているとして，反りが無くなる可能性を図示した．修正作業は，直定規を当てながら反りを確認し，アーク柱を飛ばしては冷却するのを待ち，また直定規を当て，反りの戻り具合を確認しながらの，作業を進めた．

3．結果

大気圧の状態で，チェンバーにフランジを乗せ前述した方法により，すき間を測定した。表 2 に修正前と修正後の測定値を表示する．

表2. 修正前･後のすき間

角度 (deg)	修正前 (mm)	修正後 (mm)
0	1.90	2.25
45	2.60	2.40
90	3.17	2.50
135	2.50	2.45
180	1.85	2.35
225	2.55	2.12
270	3.60	2.52
315	2.95	2.70

修正後の，すき間のバラツキはかなり少なくなり最高値と最低値の差も 0.58 mmに改善されている．
図 5 は，表 2 の値をグラフにしたものである．

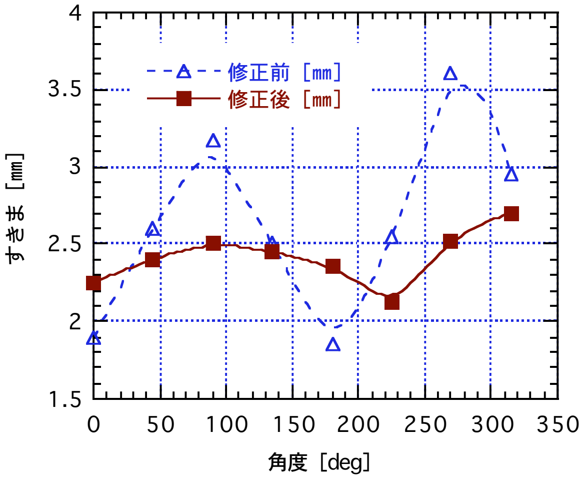


図 5：修正前・修正後のすき間

なお，チェンバーを真空にする時，フランジをボルトで締めておかなくとも，ターボ分子ポンプを作動させる領域まで真空度が上がり，到達真空度も改善の兆候が見えている.

４．おわりに

本作業で反りの修正を行なったフランジは，何の問題もなくチェンバーに搭載され稼働している．この作業にかかった時間は，約 1 時間.
またすき間のデータは，作業が終わってから受け取り，直定規だけで作業を進め良い結果が出た.

この依頼品は，フランジの板厚を薄くし，強度に不安が在るので等辺山形鋼を補強したため，切削加工は最後の手段になる.

切削加工するとしても，フランジには製品として外周にタップ穴があけてあり，旋盤で切削すれば必ずチッピングを起こし，O リングの当たり面を仕上げるのは，かなり時間がかかりそうだと判断した．また図 2 の様に平行な面が無いので，どこに基準を持っていくか難しく，しかも削り代が多いと，強度の面で使い物にならない．反りの矯正は知識として知っていても，行った事の無い作業なので，不安もあったが，思った以上に反りが戻り，短時間で作業が済みすぐ使える状態になった．この方法は，板の材料の片面だけを削って，反りが出たときの修正等にも使えると思う.

材料は，応力をかけて平面を出し，寸法が出ているのだから，その応力が開放されれば，必ず反りが出る．そういうときに，この方法である程度の修正が可能である．ただし TIG 溶接の出来るものに限られる.

技術とは漸漸習得するものであり，経験を積まないと身に付かないと思うし，時間のかかるものだと思う．しかし本の知識で知っていても，実践する機会が無いと，決して自分のものにはならない.

謝辞

本作業を行なうきっかけを下さった，物理学系青木保夫助教授に，感謝いたします．行った事が無い作業で失敗するかも分からない，しかし寛大にやってみてくれと言われ，また新しい技術を身に付けることが出来ました.

また，物理学系奥村紀浩研究官には，すき間のデータを提供していただき，本当に感謝しています.
このデータがなければ，本報告は作成できませんでした.

参考文献

[1] 石川健司，真空チェンバーの製作，筑波大学技術報告 No.22.（2002）49.
[2] 社団法人溶接学会編：「改訂 3 版 溶接便覧」（丸善 1977） 129.
[3] 鈴木春義，「改訂版 最新溶接ハンドブック」，（山海堂 1977）341.

筑波大学技術報告 №.２４
第３回筑波大学技術職員技術発表会報告集

平成１６年３月発行

編 集　筑波大学技術報告編集委員会
　　　　第３回筑波大学技術職員技術発表会実行委員会

発 行　筑波大学研究協力部研究協力課
　　　　筑波大学人間総合等教育研究支援室
　　　　〒３０５－８５７７
　　　　茨城県つくば市天王台1－1－1
　　　　電話　０２９（８５３）２２９６

第３回筑波大学技術職員技術発表会実行委員会

実行委員長
　高木英明 筑波大学研究担当副学長

実行委員
［人間総合等教育研究支援室］
　森田　倫子（実行委員代表）医学カリキュラム室
　石山　隆行　人間総合等教育研究支援室長
　鈴木　　清　総務・研協主任専門職員
　寺西　正明　医学フォトセンター
　稲月　一高　生命科学動物資源センター
　林　剛人丸　芸術学系工房
　大神　明子　基礎医学系
　工藤美奈子　社会医学系
　小林　浩三　医学工作室
　菅江　則子　医学電子顕微鏡室
　須藤　伝悦　医学電算機室
［人文・数理等教育研究支援室］
　内田　豊春　工作センター
　近藤　　裕　低温センター
　嶋　　頼子　プラズマ研究センター
　平田　久子　物理学系
　松尾　邦夫　アイソトープセンター
　大和　良広　加速器センター
［生命・情報等教育研究支援室］
　鈴木　秀則　電子情報工学系
　中島　　孝　機能工学系
　中原　繁男　物理工学系